



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

TICIANA MARIA LÚCIO DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOINSETICIDA DE SBTI E VICILINA DE
Erythrina velutina EM ENZIMAS DIGESTIVAS E MEMBRANA
PERITRÓFICA DE LARVAS DE *Plodia interpunctella*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

**NATAL
2007**

TICIANA MARIA LÚCIO DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO BIOINSETICIDA DE SBTI E VICILINA DE
Erythrina velutina EM ENZIMAS DIGESTIVAS E MEMBRANA
PERITRÓFICA DE LARVAS DE *Plodia interpunctella*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Maurício Pereira de Sales

**NATAL
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A524a

2007 Amorim, Ticiania Maria Lúcio de.

Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) / Ticiania Maria Lúcio de Amorim. — Natal, 2007.

81f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências.

Referências.

Orientador: Dr. Maurício Pereira de Sales.

1. Enzima. 2. Membrana Peritrófica. 3. *Plodia interpunctella*. 4. Inibidores I. Título.

CDU- 577.15(043)

À minha mãe, Gisélia, pelo apoio e incentivo incondicionais, pelo carinho e compreensão imensuráveis e pela força que sempre demonstrou e me mostrou, dessa forma, como devo (e quero) ser.

Às minhas irmãs, Tatiana e Daniela, pelo incentivo e presença nos momentos de tristeza e saudade.

A Leo, amor da minha vida, agradeço por todos os momentos de consolo, carinho, compreensão, desde o início. Se termino esta fase da minha vida com sucesso, devo muito a você, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Maurício por todo o aprendizado e por ter me oferecido a oportunidade de descobrir o que realmente gosto.

À Katya pelo teto, pela companhia, por compartilhar sua vida comigo e por me deixar compartilhar a minha com ela; à Gigi, pelas gargalhadas, pelas madrugadas no lab (esse vale para todos), pela grande demonstração de amizade no fim do mestrado, pela companhia; a Léo, companheiro de horas e horas e horas de trabalho, agradeço mesmo por ter me agüentado tanto tempo, obrigada pela calma e pelos conselhos.

A vocês agradeço por ser uma família onde eu não tinha nenhuma.

À Joelma, minha aluna de graduação mais inteligente, por ter “salvo minha vida” quando eu precisei (e muito). Muito obrigada pelos intestinos e pela companhia, pela doçura e pela descontração.

À Virgínia e Ana Celly por terem aparecido na minha vida sem ser tarde demais pra gente realmente se conhecer.

Aos meninos do lab: Ludo (apesar de tanta implicância), Rho (pelas gentilezas, na maioria das vezes e pelas caronas), Beto (pelo carinho e altas horas de laboratório) e Huguinho (pelo carinho).

Ao pessoal que está no laboratório e aos que não estão mais: Alexandre, Adelianna, Danielle, Cley, Dayselene, Jan, Ibson, Leo (de Ana Celly), Gabi, Ju, Gil, Vitor, Kelma.

À melhor turma de mestrado, depois de tantas horas de leitura de artigos e provas de BioMol.

Ao professor Elizeu pela calma e pela disponibilidade sempre que qualquer aluno, não só eu, precisasse.

Ao professor Francisco Pepino por ter me cedido o Lab de moscas-das-frutas e pela preocupação comigo e com o andamento do trabalho.

À professora Adriana Uchôa pela grande ajuda nos últimos experimentos.

Aos professores da banca de qualificação, Márcio Zikán e Fátima Ximenes, pelas sugestões que só fizeram enriquecer este trabalho.

A Carlos Maia pelas fotos dos géis de atividade.

A Duda pelas cápsulas utilizadas nos bioensaios.

À professora Kátia Scortecci pela gentileza de ter disponibilizado o microscópio para os últimos experimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica pela ajuda, direta ou indireta, na realização deste trabalho.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e BNB.

"Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só." (Amir Klink)

RESUMO

Plodia interpunctella (traça-indiana-da-farinha) é uma praga cosmopolita que ataca não somente uma ampla gama de produtos armazenados, mas também outros produtos alimentícios. Devido a sua importância econômica várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de identificar um método capaz de controlar esta praga sem danos ao ambiente. O estudo de inibidores de enzimas digestivas, lectinas e proteínas que se ligam à quitina tem sido proposto como uma alternativa para controlar o dano causado por estes insetos. Neste estudo alvos específicos para inibidores de enzimas e proteínas ligantes à quitina foram identificados nas larvas desta praga. Para isso, durante o desenvolvimento de larvas de *P. interpunctella* as classes de enzimas digestivas alvos foram identificadas por ensaios de atividade *in vitro* e SDS-PAGE, pH e temperatura ótimos avaliados para a indicação de possíveis proteínas inibidoras para a principal classe de proteinase detectadas no intestino das larvas. Outro alvo para proteínas deletérias foi indicado pela identificação da membrana peritrófica por ensaios químicos de detecção de quitina e por microscopia de luz. Durante o período de desenvolvimento as larvas de *P. interpunctella*, alimentadas com uma dieta baseada em bagaço de cana, passaram por 5 instares e pelo estágio pré-pupal. A maior atividade proteolítica (UA/intestino) foi detectada no estágio pré-pupal, enquanto que a maior atividade proteolítica específica (UA/mg proteína) foi observada no terceiro ínstar, utilizando azocaseína como substrato a pH 9,5 e a 50°C. A inibição das proteinases presentes no homogenato intestinal de larvas de terceiro ínstar foi mais evidente quando inibidores de proteinases serínicas (SBTI, TLCK e PMSF, com 96%, 89% e 20% de inibição, respectivamente) foram utilizados nos ensaios. No estágio pré-pupal, a maior inibição observada foi com SBTI (96%), TLCK (81 %) e TPCK (20%), indicando a predominância de atividade enzimática de proteinases serínicas a pH 9,5 no intestino de *Plodia interpunctella*. Por zimograma foi observada inibição de bandas de menor massa molecular por TLCK e um atraso na corrida eletroforética dessas bandas causado por SBTI. Quando avaliado o efeito *in vivo* de SBTI no desenvolvimento larval, não foi observada mortalidade e nem efeito na massa das larvas sobreviventes. Estabelecido o segundo alvo de atuação, baseado na ligação à quitina, bioensaios usando a vicilina EvV foram realizados, onde um LD₅₀ de 0,23% e um WD₅₀ de 0,27% foram estabelecidos para esta proteína deletéria. O mecanismo de ação foi verificado por ensaios de digestibilidade de EvV durante a passagem pelo trato intestinal larval, sendo observado o envolvimento de um fragmento reativo, observado por imunodeteção, no efeito deletério da vicilina. A ligação de EvV à membrana peritrófica foi comprovada através de ensaios de imunohistoquímica. Estes resultados apontam para uma vicilina ligante à quitina que pode vir a ser utilizada como bioinseticida para *Plodia interpunctella*.

Palavras-chave: *Plodia interpunctella*, inibidores, membrana peritrófica, enzima.

ABSTRACT

Plodia interpunctella (Indian meal moth) is a cosmopolitan pest that attacks not only a wide range of stored grain as well other food products. Due to its economic importance several researches have focused in a method with ability to control this pest with few or no damage to the environment. The study of digestive enzymes inhibitors, lectins and chitin-binding proteins, has often been proposed as an alternative to reduce insect damage. In this study we report the major classes of digestive enzymes during larval growth in *P. Interpunctella*, being those proteinases actives at pH 9.5 and optimum temperature of 50 °C to both larvae of the 3rd instar and pre-pupal stage of development. *In vitro* and zymogram assays presented the effects of several inhibitors, such as SBTI, TLCK and PMSF to intestinal homogenate of 3rd instar larvae of 62%, 92% and 87% of inhibition and In pre-pupal stage of 87%, 62 % and 55% of inhibition, respectively. Zymograms showed inhibition of two low molecular masses protein bands by TLCK and that in presence of SBTI were retarded. These results are indicative of predominance of digestive serine proteinases in gut homogenate from *Plodia interpunctella* larvae. This serine proteinase was then used as a target to evaluate the effect of SBTI on larvae in *in vivo* assay. Effect of SBTI on mortality and larval mass was not observed at until 4% of concentration (w/w) in diets. Chitin, another target to insecticidal proteins, was observed by chemical method. Moreover, optic microscopy confirmed the presence of a peritrophic membrane. Established this target, *in vivo* effect of EvV, a chitin binding vicilin, evaluated during the larval development of *P. interpunctella* and was obtained a LD₅₀ of 0,23% and WD₅₀ of 0,27% to this protein. Mechanism of action was proposed through of the *in vivo* digestibility of EvV methodology. During the passage through the larval digestive tract was observed that EvV was susceptible to digestive enzymes and a reactive fragment, visualized by Western blotting, produced by digestion was recovered after dissociation of the peritrophic membrane. The bound of EvV to peritrophic membrane was confirmed by immunohistochemical assays that showed strong immunofluorescent signal of EvV-FITC binding and peritrophic membrane. These results are a indicative that vicilins could be utilized as potential insecticide to *Plodia interpunctella* and a control methods using EvV as bioinsecticide should be studied to reduce lost caused by storage insect pests.

Key words: *Plodia interpunctella*, inhibitors, peritrophic membrane, enzyme.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Larva de <i>Plodia interpunctella</i>	17
Figura 2. Esquema de montagem do “sanduíche” para eletrotransferência de proteínas de gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose.....	40
Figura 3. Detecção das atividades proteolíticas no homogenato intestinal durante o desenvolvimento larval	45
Figura 4. Curva de pH para a detecção do pH ótimo para atividade das enzimas proteolíticas presente no HI de larvas de terceiro e sexto ínstaes de <i>P. interpunctella</i>	46
Figura 5. Curva de temperatura para a detecção da temperatura ótima de atividade para enzimas proteolíticas presente no HI de larvas de terceiro e sexto ínstaes de <i>P. interpunctella</i> em pH 9,5.. ..	47
Figura 6. Efeito de inibidores específicos de classes mecanísticas de enzimas proteolíticas sobre a atividade do homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto ínstaes de <i>P. interpunctella</i>	49
Figura 7. Zimograma do homogenato intestinal (HI) de larvas de <i>P. interpunctella</i> utilizando azocaseína como substrato a pH 9,5	50
Figura 8. Zimograma do homogenato intestinal (HI) de larvas de <i>P. interpunctella</i> utilizando azocaseína como substrato a pH 9,5	51
Figura 9. Efeito de SBTI adicionado à dieta durante o desenvolvimento larval de <i>P. interpunctella</i>	52
Figura 10. Efeito de SBTI sobre o número de ínstaes de <i>P. interpunctella</i>	53
Figura 11. Efeito de EvV adicionado à dieta durante o desenvolvimento larval de <i>P. interpunctella</i>	54
Figura 12. Efeito de EvV sobre o número de ínstaes de <i>P. interpunctella</i>	55
Figura 13. Digestibilidade de EvV <i>in vivo</i> pelas larvas de <i>P. interpunctella</i>	56
Figura 14. Ensaio de afinidade <i>in vivo</i> de EvV pela Membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i> visualizada por imunoblot	57
Figura 15. Fotomicrografia de fluorescência e óptica da membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i> alimentados em dietas contendo EvV-FITC acrescida ou não de N-acetil D-glicosamina.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ordens e famílias de insetos que se alimentam de sementes	13
Tabela 2. Classificação das Endopeptidases baseada nos aminoácidos do centro ativo envolvidos na reação de catálise e a faixa de pH ótimo da reação enzimática em que cada grupo de proteinase atua (STOREY & WAGNER, 1986).....	19
Tabela 3. Classificação das Exopeptidases.....	20
Tabela 4. Composição da dieta artificial de <i>P. interpunctella</i>	31
Tabela 5. Medida das cápsulas cefálicas durante o desenvolvimento larval de <i>P. interpunctella</i>	44
Tabela 6. Detecção de quitina em intestinos de larvas de <i>P. interpunctella</i> através de teste de Von Wisseling.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

E-64 – L-trans-epoxisuccinil-leucilamida (4-guanidino)-butano

EvV – Vicilina de *Erythrina velutina*

FITC – Fluoresceína-5-isotiocianato

kDa - quilodaltons

LD₅₀ – dose letal

HI – Homogenato intestinal

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - nanômetros

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoreto

SBTI – inibidor de tripsina de soja

SDS – dodecil sulfato de sódio

TEMED – N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino

TLCK – N-p-tosil-lisina clorometilcetona

TPCK – tosil-L-fenilalanina clorofenilcetona

Tris – tris hidroximetil aminometano

UA/mg prot – unidades de atividade por proteína

UA/int - unidades de atividade por intestino

WD₅₀ – quantidade de inibidor que reduz em 50% o peso das larvas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 - Considerações gerais	13
1.2 - <i>Plodia interpunctella</i> (Traça indiana da farinha)	14
1.3 - Sistema digestório dos insetos	17
1.4 - Enzimas proteolíticas de insetos	19
1.5 - Proteínas relacionadas à defesa de plantas contra pragas e patógenos	22
1.5.1- Inibidores de proteinases	22
1.5.2- Lectinas.....	24
1.5.3 – Vicilinas	25
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Materiais	29
3.1.1 – Insetos.....	29
3.1.2 – Proteínas utilizadas nos bioensaios	29
3.1.3 – Animais	29
3.1.4 – Reagentes.....	29
3.1.5 – Equipamentos	30
3.2 - Métodos.....	31
3.2.1 - Criação de <i>Plodia interpunctella</i>	31
3.2.2 - Determinação do número de ínstares larvais.....	31
3.2.3 - Dissecção das larvas	32
3.2.4 – Preparo de extratos intestinais de larvas	32
3.2.5. – Ensaios de atividade proteolítica de homogenato intestinal de larvas de <i>P. interpunctella</i>	33
3.2.5.1 - Preparo de Solução de Azocaseína a 1,5%	33
3.2.5.2 - Determinação da Atividade Azocaseinolítica	33
3.2.5.3 - Preparo de Solução de Hemoglobina a 1%.....	33
3.2.5.4 - Determinação da Atividade Hemoglobínica	34
3.2.6 – Efeito do pH sobre a atividade azocaseinolítica do homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto ínstares.....	34
3.2.7 – Efeito da temperatura sobre a atividade azocaseinolítica a pH 9,5.....	35
3.2.8 – Determinação das classes mecanísticas das enzimas proteolíticas de homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto ínstares.....	35
3.2.9 - Ensaio da Atividade em Gel de Poliacrilamida com SDS.....	35
3.2.10 - Detecção de quitina no intestino médio de larvas de <i>P. interpunctella</i> .	36
3.2.11 – Efeito de SBTI e EvV sobre larvas de <i>Plodia interpunctella</i> em um sistema de dieta artificial	37
3.2.12 - Mecanismo de ação de vicilinas de <i>Erythrina velutina</i>	37
3.2.12.1. - Digestibilidade <i>in vivo</i> de EvV pelas larvas de <i>P. interpunctella</i>	37
3.2.13 – Detecção de EvV-FITC em membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i>	41
3.2.13.1 - Conjugação covalente de EvV-FITC	42
3.2.13.2 – Localização fluorescente de EvV-FITC na membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i> e ensaio de inibição de ligação com N-acetil D-glicosamina.....	42
3.2.14 - Análises estatísticas.....	43
4. RESULTADOS	44

4.1. Detecção e caracterização das classes mecanísticas das enzimas proteolíticas alvos envolvidas nos processos digestórios durante o desenvolvimento larval de <i>P. interpunctella</i>	44
4.1.1 - Determinação do número dos estágios larvais	44
4.1.2 - Detecção das atividades proteolíticas no homogenato intestinal (HI) durante o desenvolvimento larval.....	44
4.1.3 - Determinação do pH ótimo das atividades proteolíticas presentes no Homogenato intestinal (HI) de larvas de terceiro ínstar e pré-pupa	46
4.1.4 - Determinação da temperatura ótima das atividades proteolíticas presentes no HI de larvas de terceiro e sexto ínstar	47
4.1.5 - Efeito de inibidores específicos de classes de enzimas proteolíticas sobre a atividade do homogenato intestinal de larvas de terceiro ínstar e pré-pupa ...	48
4.1.6 - Caracterização por Zimograma das enzimas presentes no homogenato intestinal de larvas do terceiro e sexto ínstar	48
4.2. Efeito do inibidor de tripsina de soja (SBTI) sobre as enzimas serínicas alvos do HI de larvas de <i>P. interpunctella</i>	51
4.3. Efeito da vicilina de <i>E. velutina</i> (EvV) sobre as larvas de <i>P. interpunctella</i>	53
4.4. Modelo de ação de vicilinas de <i>E. velutina</i> para larvas de <i>P. interpunctella</i> ...	55
4.4.1 - Digestibilidade in vivo de vicilina de <i>E. velutina</i> pelas larvas de <i>P. interpunctella</i>	55
4.4.2 - Associação <i>in vivo</i> de EvV por constituintes de membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i>	56
4.4.2.1 - Detecção de quitina em membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i>	56
4.4.2.2 – Ensaio de afinidade, <i>in vivo</i> , de EvV à membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i>	56
4.4.2.3 - Detecção da associação EvV-FITC em membrana peritrófica de larvas de <i>P. interpunctella</i> por fluorescência	57
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações gerais

Um grande número de ordens da classe Insecta compreende espécies que atacam sementes, sejam elas imaturas, maduras ou armazenadas. Os insetos que se alimentam de sementes verdes são denominados sugadores e os que se alimentam de sementes maduras são denominados mastigadores (PANIZI & PARRA, 1991; XAVIER-FILHO, 1993) e compreendem famílias de várias ordens (Tabela 01), dentre os quais destacam-se os bruquídeos (Coleoptera: Bruchidae) e as traças (Lepidoptera: Pyralidae) que se especializaram na atividade predatória de sementes maduras armazenadas (PANIZI & PARRA, 1991; XAVIER-FILHO, 1993).

Tabela 1. Ordens e famílias de insetos que se alimentam de sementes

Hábito alimentar	Ordem	Famílias
Mastigadores	Coleoptera	Anobiidae Bruchidae Cerambycidae Curculionidae Scolytidae Bostrichidae Tenebrionidae
	Lepidoptera	Incurvariidae Noctuidae Olethreutidae Pyralidae Tortricidae Gelechiidae
	Hymenoptera	Agaonidae Eurytomidae Formicidae Torymidae
	Orthoptera	Tettigoniidae
	Diptera	Agromyzidae Cecidomyiidae Tephritidae

Tabela adaptada de Xavier-Filho J., Sementes e suas defesas contra insetos, 1993.

A estrita associação dos insetos com sementes de plantas se deu através de processos co-evolucionários (SALES *et al.*, 2000). O desenvolvimento de respostas como, por exemplo, a detoxificação ou a excreção da toxina presentes nas sementes, os capacitava a utilizar a planta alvo através de um processo de adaptação e contra-adaptação (ERLICH & RAVEN, 1964; CHRISPEELS *et al.*, 1998; MELO *et al.*, 1999). Esses insetos resistentes rapidamente se tornam dominantes na população, por usarem como fonte exclusiva de alimento aquela planta que, outrora, lhes foi tóxica (HARBONE, 1982; HOWE & WESTLEY, 1988; CHRISPEELS *et al.*, 1998). Por exemplo *Sitophilus sp.* (Bruchidae) que infesta grãos de cereais, têm níveis tão altos de α -amilase que é capaz de superar os inibidores daquela enzima presentes nos grãos (GROSSI-DE-SÁ & CHRISPEELS, 1997).

As larvas de várias espécies de traças, como *Plodia interpunctella*, são consideradas as principais predadoras de grãos armazenados, responsáveis por grandes perdas, no período pós-colheita (GATEHOUSE *et al.*, 1995; LE BERRE-ANTON *et al.*, 2000). Dentre os grãos atacados, os de leguminosas e cereais são considerados produtos básicos na alimentação humana, sendo importantes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas do complexo B e minerais (MALDONADO *et al.*, 1996; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996).

1.2 - *Plodia interpunctella* (Traça indiana da farinha)

P. interpunctella (Figura 1) é considerada a principal praga de produtos armazenados no mundo (REES, 2004; MOHANDASS *et al.*, 2006). Os principais alimentos consumidos pela larva deste inseto são sementes (NA & RYOO, 2000), amendoim (MBATA, 1987), amêndoas (COX & BELL, 1991), nozes (JOHNSON *et al.*, 1992), e alimentos processados (SIMMONS & NELSON, 1975) como passas e

ameixas secas (JOHNSON *et al.*, 1995; COX & BELL, 1991). A infestação por larvas não causa, somente, danos ao produto como também pode servir de entrada para fungos e bactérias.

Os ovos de *P. interpunctella* são pequenos, com excrescências arredondadas e carenas proeminentes. O comportamento de oviposição é estimulado pelo odor do alimento (PHILLIPS & STRAND, 1994) onde as fêmeas depositam entre 100 a 500 ovos isolados ou em grupos, sobre os produtos que ataca (MULLEN & ARBOGAST, 1977, ARBOGAST & MULLEN, 1978). Quando completamente desenvolvidas, as larvas medem cerca de 13 mm de comprimento e possuem 3 pares de pernas verdadeiras e 4 de pernas falsas nos 3º, 4º, 5º e 6º segmentos abdominais. São muito ativas e à medida que se alimentam vão deixando uma fiação sedosa, à qual vão se acumulando dejetos e partículas de grãos, acabando por formar uma manta característica, que pode chegar a cobrir toda a superfície de contato com o alimento (MOHANDASS *et al.*, 2006). A diapausa geralmente acontece no 5º ínstar, depois que o período de alimentação cessou, mas interferências ambientais podem fazer com que este evento aconteça mais cedo no desenvolvimento. O inseto adulto é uma mariposa de hábitos noturnos, com cerca de 18 a 20 mm de envergadura. O ciclo de vida de *P. interpunctella* varia em função da temperatura e umidade relativa do ar e também pelo tipo de alimento consumido durante o desenvolvimento larval. O número de instares também é influenciado pelos mesmos fatores, variando entre 5 a 7 (ALLOTEY & GOSWAMI, 1990).

O controle de *P. interpunctella* é feito principalmente através de agentes químicos, entretanto o inseto vem demonstrando resistência aos compostos utilizados pelos produtores, como organofosfatos (ARTHUR & PHILLIPS, 2003). A fumigação, uma forma de controle amplamente utilizada, é uma técnica empregada

para eliminar qualquer infestação de pragas nos grãos, mediante uso de gás. Outra forma de controle se dá através da utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* (CANDAS *et al.*, 2003), bem como de Manejo Integrado de Pragas (MIP). O manejo integrado de pragas consiste em conhecer e integrar todas as técnicas e medidas disponíveis, para manter a qualidade do grão durante todo o período de armazenamento. Para realizar o controle de pragas, é de extrema importância que se faça o manejo adequado dos diversos fatores que podem influenciar na eficiência do controle, dentre elas pode-se citar a identificação correta da praga; tipo de unidade armazenadora; condições de aplicação de inseticida; eficiência de inseticidas empregados; monitoramento das pragas e da sua resistência aos inseticidas utilizados (MAIA & DOURADO, 2004). Estes fatores levam à adoção de práticas mais eficazes no controle de pragas de armazenamento, menos agressivas ao meio ambiente e não prejudiciais à saúde do produtor e do consumidor.

O sistema digestório dos insetos é a região interna de maior exposição deste com o meio ambiente, dessa forma, estratégias que visem interferir na bioquímica e fisiologia desta região, buscando a redução da absorção de nutrientes, seriam eficientes no manejo de pragas. A bioprospecção de moléculas capazes de interferir nos processos digestórios dos insetos, via inibição das enzimas digestórias e ou utilizando moléculas capazes de romper ou ligar-se à membrana peritrófica, que serve de proteção ao epitélio intestinal de insetos pode fornecer ferramentas para o MIP. Uma outra abordagem empregada no manejo de pragas seria a produção de plantas transgênicas que expressem proteínas bioativas (inibidores de enzimas e/ou ligantes/degradadoras de membrana peritrófica) contra insetos pragas.



Reino: Animal
Filo: Artropoda
Classe: Insecta
Ordem: Lepidoptera
Família: Pyralidae
Subfamília: Phycitinae
Gênero: Plodia
Espécie: *Plodia interpunctella*

Figura1. Larva de *Plodia interpunctella*

1.3 - Sistema digestório dos insetos

O aparelho digestório é um tubo que percorre todo o corpo do inseto, desde a boca até ânus. O canal alimentar é composto pelo estomodeu (intestino anterior), mesêntero (intestino médio) e proctodeu (intestino posterior), onde o principal local de absorção e digestão é o intestino médio (TERRA & FERREIRA, 1994). Em muitos insetos o intestino médio contém uma membrana semipermeável não celular, a matriz peritrófica (ou membrana peritrófica) que separa esta região em duas partes: o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Esta membrana isola o conteúdo do lúmen do intestino das células digestivas epiteliais que revestem o intestino médio formando, assim, uma estrutura protetora ao longo da região do intestino (TELLAM, WIJFFELS, WILLADSEN, 1999). Esta membrana é aparentemente ausente nos insetos pertencentes às seguintes ordens: Phthiraptera, Psocoptera, Thysanoptera, Diploglossata, Zoraptera, Strepsiptera, Raphidioptera, and Megaloptera (PETERS, 1992).

A membrana peritrófica desempenha diversas funções relacionadas à digestão em insetos, tais como a facilitação do processo digestivo no intestino, compartimentalização de eventos digestivos agindo como uma barreira permeável para enzimas digestivas (TERRA 1990), bem como envolvimento na defesa do inseto contra infecção por vírus e parasitas (TELLAM, WIJFFELS, WILLADSEN 1999), prevenção de danos ou obstrução das microvilosidades do intestino médio

pelo conteúdo do lúmen (BERNER; RUDIN & HECKER, 1983; SECUNDINO, EGER-MANGRICH *et al.*, 2005).

Dois tipos de membrana peritrófica foram definidos com base no local de sua síntese (PETERS, 1992). O tipo 1 é sintetizado por todas as células epiteliais do intestino médio e forma uma estrutura semelhante a uma “bolsa” que contém o alimento ingerido. Tipicamente, a membrana do tipo 1 é produzida em resposta direta à ingestão do alimento mas, também, pode ser constitutivamente produzida, por exemplo em gafanhotos (BAINES, 1978; RAMOS; MAHOWALD & JACOBSLORENA, 1994; LEHANE, 1997). O tipo 2 de membrana peritrófica é constitutivamente produzido pela cardia, situada na região do intestino médio anterior, sendo freqüentemente mais estruturada que o tipo 1 (LEHANE, 1997). As proteínas que compõem a membrana são determinantes de sua estrutura e a ligação destas proteínas à quitina desempenha um importante papel para a formação da membrana (TELLAM, WIJFFELS, WILLADSEN 1999; GUO *et al.*, 2005).

A quitina é a estrutura formadora das microfibrilas da membrana peritrófica (LEHANE, 1997). Este carboidrato é um polímero constituído por uma seqüência linear de β -(1 \rightarrow 4) 2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose (ou N-acetilglicosamina) e sua síntese é ativada por tripsina e outras proteases serínicas na maioria dos insetos, sugerindo que a enzima responsável pela síntese da quitina, a quitina-sintase, é sintetizada como um zimogênio. Em insetos, a quitina-sintase é uma grande proteína transmembrana com massa molecular de cerca de 170 kDa e ponto isoelétrico levemente ácido. A formação da quitina pode ser dividida em três passos distintos, onde no primeiro passo, as enzimas com domínio catalítico se aproximam do sítio citoplasmático e forma o polímero, o segundo passo envolve a translocação do

polímero que está sendo formado através da membrana e sua liberação no espaço extracelular e por fim no terceiro passo, o polímero forma microfibrilas cristalinas (MERZENDORFER, 2006).

1.4 - Enzimas proteolíticas de insetos

As enzimas proteolíticas (proteases) estão divididas em duas classes principais: endopeptidases e exopeptidases. As primeiras hidrolisam ligações peptídicas internas, ao passo que as outras hidrolisam ligações N-terminais ou C-terminais. As endopeptidases (ou proteinases) são classificadas de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes grupos, baseando-se em comparação entre sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional destas (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação das Endopeptidases baseada nos aminoácidos do centro ativo envolvidos na reação de catálise e a faixa de pH ótimo da reação enzimática em que cada grupo de proteinase atua (STOREY & WAGNER, 1986).

Endopeptidases ou Proteinases				
	Serínica	Cisteínica	Aspártica	Metaloproteinase
Centro ativo	Serina e Histidina	Cisteína	Asparagina e Tirosina	Íon metálico
Faixa de pH	7,0 – 9,0	4,0 – 7,0	Abaixo de 5,0	7,0 – 9,0
Inibidores	TPCK, TLCK, PMSF, SBTI	E-64, Iodoacetamida	Compostos diazo	EDTA, Fenantrolina

As exopeptidases são classificadas em seis grupos, de acordo com sua ação hidrolítica na extremidade amino ou carboxi terminal e o tamanho da cadeia (Tabela 3) (STOREY & WAGNER, 1986).

Tabela 3. Classificação das Exopeptidases

Exopeptidases	Atividades	Alvo	Local
Aminopectidases	Remoção	Aminoácidos	Porção N-terminal
Carboxipeptidases	Remoção	Aminoácidos	Porção C-terminal
Dipeptil peptidases	Remoção	Dipeptídeos	Porção N-terminal
Peptil dipeptidases	Remoção	Dipeptídeos	Porção C-terminal
Dipeptidases	Clivagem	Dipeptídeos	Porções N e C-terminais
Tripeptidases	Clivagem	Tripeptídeos	Porções N e C--terminais

As proteinases serínicas compõem a classe mais comum das enzimas proteolíticas em muitas espécies de insetos (APPLEBAUM, 1985; TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA & CRISTOFOLETTI, 1996) e dominam o ambiente intestinal larval, contribuindo com aproximadamente 95% da atividade digestiva total (SRINIVASAN; GIRI & GUPTA, 2006). Segundo Terra *et al.* (1996), enquanto as tripsinas degradam ligações internas de cadeias polipeptídicas no lado carboxil dos aminoácidos básicos (arginina e lisina), as quimotripsinas clivam os substratos no lado carboxil dos aminoácidos hidrofóbicos (tirosina, triptofano, leucina e fenilalanina). Essas enzimas são mais ativas em pH alcalino, não são ativadas por íons cálcio, e são sensíveis a inibidores naturais de tripsina (VOLPICELLA *et al.*, 2006). Algumas quimotripsinas foram purificadas e caracterizadas de alguns insetos da ordem Lepidoptera (CHRISTELLER *et al.*, 1992). Estas quimotripsinas têm atividade ótima em pH alcalino, em acordo com as condições alcalinas dos intestinos médios da maioria dos insetos (MUHARSINI *et al.*, 2001). Como em lepidópteros: *Lacanobia oleracea* (GATEHOUSE *et al.*, 1999), *Ostrinia nubilalis* (BERNARDI *et al.*, 1996); nos hemípteros: *Nilaparvata lugens* (FOISSAC *et al.*, 2002); *Creontiades dilutus* (COLEBATCH; EAST & COOPER, 2001); *Lygus hesperus* (ZENG; ZHU & COHEN, 2002); em coleópteros: *Tenebrio molitor*, *Pyrearinus termitilluminans* e *Pheropsophus aequinoctialis* (TERRA & CRISTOFOLETTI, 1996); *Prostephanus truncatus* (VASQUEZ-ARISTA *et al.*, 1999); *Melolontha melolontha* (WOLFGANG;

MÖHRLEN; SCHNETTER, 2002); e na ordem Diptera: *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI *et al.*, 2001), *Phlebotomus papatasi* (RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2003), *Stoxomys calcitrans* (MOFFAT; BLAKEMORE & LEHANE, 1995), *Lucilia cuprina* (CASU *et al.*, 1994), *Anopheles gambiae* (MULLER *et al.*, 1993) e *Ceratitis capitata* (SILVA *et al.*, 2006).

Proteinases aspárticas são encontradas no intestino de insetos, especialmente em bruquídeos, que se alimentam de grãos armazenados (SILVA, 2006) e em insetos hematófagos (TERRA & FERREIRA, 1994). Já proteinases cisteínicas são comumente encontradas no intestino médio de Hemiptera, Heteroptera e em coleópteras da família Bruchidae (TERRA & FERREIRA, 1994; XAVIER-FILHO & COELHO, 1980; WIEMAN & NIELSEN, 1988).

Poucos trabalhos relatam atividade enzimática de exopeptidases em insetos. Mittapalli *et al.* (2006) identificaram a presença de carboxipeptidases na saliva de *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). Esta enzima foi expressa em todas as fases de desenvolvimento e detectada na glândula salivar e tecidos gordurosos, mas não em tecidos do intestino médio. Todas as carboxipeptidases isoladas foram caracterizadas pela presença de uma tríade catalítica conservada de Serina-Asparagina-Histidina semelhante às proteinases serínicas (LEHFELDT *et al.*, 2000; MITTAPALLI *et al.* 2006).

Detecção de carboxipeptidases no intestino de Lepidópteros tem sido dificultada devido à falta de um sistema de ensaio sensível e específico (BOWN *et al.*, 1998). Apesar disso foi detectada esta atividade, usando substratos sintéticos, em larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Extrato de intestino de larvas de quarto ínstar deste inseto exibiu atividade *in vitro* contra o substrato

sintético, com atividade máxima a pH 8,0 (BOWN; WILKINSON & GATEHOUSE, 1998).

1.5 - Proteínas relacionadas à defesa de plantas contra pragas e patógenos

Mais de cem milhões de anos de coevolução permitiram às plantas adquirir vários mecanismos efetivos que as protegem do ataque por fitopatógenos e herbívoros. Dentre os mecanismos químicos destacam-se os baseados em proteínas que mostram efeito tóxico ou antimetabólico. Entre estas proteínas destacam-se os inibidores de enzimas digestivas, as lectinas, as proteínas ligantes à quitina, enzimas relacionadas à patogênese, tais como as proteínas inativadoras de ribossomos, quitinases, lipoxigenases, acilhidrolases (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; DUNAEVSKY, 2004). Dentre estas proteínas bioativas, os inibidores, lectinas e mais recentemente as vicilinas ligantes à quitina têm sido muito analisadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* contra pragas/patógenos a fim de indicar estas moléculas como potenciais biopraguicidas e/ou biofungicidas.

1.5.1- Inibidores de proteinases

Os inibidores protéicos reduzem a atividade de enzimas digestivas impedindo a absorção de nutrientes. Estes são classificados de acordo com as enzimas que inibem: inibidores de enzimas serínicas, cisteínicas, aspárticas e inibidores de metaloproteinases (STOREY & WAGNER, 1986). Os inibidores de proteinases serínicas são, em geral, proteínas pequenas, estáveis e abundantes, que mostram especificidade à quimotripsina e/ou tripsina (BODE & HUBER, 2000). Inibidores serínicos foram detectados e purificados em órgãos de reserva de plantas (por exemplo, sementes e tubérculos) bem como em folhas e frutos (XAVIER-FILHO,

1992; ARAÚJO *et al.*, 2004). Muitos destes inibidores se ligam a enzimas cognatas de acordo com o mecanismo padrão comum tipo substrato (GRUTTER *et al.*, 1990; MELO *et al.*, 2002). Estes inibidores demonstram várias funções putativas como reguladores endógenos de atividades proteolíticas (RYAN, 1990), como proteínas de armazenamento (XAVIER-FILHO, 1992) e como um fator importante em resposta a estresses abióticos (FRANCO & MELO, 2000) e bióticos (GATEHOUSE *et al.*, 1979). O uso potencial de inibidores de proteinases para proteção de plantas contra pragas é, porém, complicado pela habilidade dos insetos em driblar as defesas das plantas (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003).

Fitocistatinas são inibidores de proteinases cisteínicas isolados de sementes de plantas. Estes inibidores têm sido identificados em uma grande variedade de espécies de plantas, tais como milho, arroz, batata, soja e maçã (ABE *et al.*, 1991, 1996; KONDO *et al.*, 1990; BOTELLA *et al.*, 1996; GRUDEN *et al.*, 1997; RYAN; LAING & MCMANUS, 1998).

Os insetos respondem *in vivo* aos inibidores de proteinases com uma variedade de mecanismos compensatórios, incluindo a produção aumentada de proteinases, produção de novas proteinases, ou a neutralização de inibidores por meio de degradação proteolítica. Em vários casos, esta estratégia provou ter êxito, como, por exemplo, para *Helicoverpa spp.* e outras pragas, como *Leptinotarsa decemlineata* Say (BOLTER & JONGSMA, 1995), *Spodoptera exigua* (JONGSMA *et al.*, 1995), *Heliothis zea* (BROADWAY, 1995) e *Helicoverpa armigera* (BOWN; WILKINSON & GATEHOUSE, 1997). Estas respostas adaptativas são um resultado evolutivo da competição constante de insetos por fontes de alimento e a produção de compostos de defesa em plantas (OPPERT & JOHNSON, 2004).

Embora inibidores de proteinases pareçam bloquear uma parte principal da atividade proteolítica do intestino de *Helicoverpa armigera*, e cause retardo no crescimento (JOHNSON *et al.*, 1989; SRINIVASAN *et al.*, 2005), nenhum inibidor foi identificado que impeça as larvas de crescer e atingir a maturidade (HARSULKAR *et al.*, 1999; BOWN; WILKINSON & GATEHOUSE 1997; VOLPICELLA *et al.*, 2006). A baixa efetividade de inibidores de proteinases demonstrada em ensaios *in vivo* para este inseto provavelmente está relacionada a uma adaptação de *Helicoverpa spp.* e de vários outros insetos polívoros a inibidores de proteinases (VOLPICELLA, 2006).

1.5.2- Lectinas

Lectinas são uma classe de proteínas de origem não-imune que possuem, pelo menos, um domínio não-catalítico que se liga especificamente e reversivelmente a mono ou oligosacarídeos. O mecanismo de ação das lectinas em insetos ainda é desconhecido.

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e várias destas moléculas já foram isoladas em plantas, vírus, bactérias, invertebrados e vertebrados, inclusive mamíferos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Várias lectinas de plantas mostraram efeito entomotóxico quando foram utilizadas como alimentos para insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera. Foi demonstrado que algumas lectinas se ligam à membrana das células epiteliais intestinais ou à membrana peritrófica dos insetos, dependendo da especificidade de ligação da proteína ao carboidrato (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

1.5.3 – Vicilinas

Um outro grupo de proteínas de defesa são as vicilinas, proteínas de natureza globulínica presente, principalmente, em sementes de leguminosas. Essas vicilinas apresentam uma propriedade peculiar de ligar-se à membrana peritrófica de insetos (MOTA *et al.*, 2003)

As vicilinas são proteínas de armazenamento da classe das globulinas 7S, caracterizadas como oligômeros de 150-170 kDa, formadas por três a cinco subunidades de 40 a 70 kDa e não possuem pontes dissulfeto (DERBYSHARE *et al.*, 1976; CASEY *et al.*, 1986). As vicilinas purificadas de sementes de leguminosas são altamente heterogêneas e consistem de muitos tipos de subunidades diferentes, exibindo um alto grau de polimorfismo dentro de cada espécie (HIGGINS, 1984). Estas incluem uma bem estudada classe de proteínas de armazenamento e podem constituir até 70-80% da proteína total das sementes (BEWLEY & BLACK, 1994). As vicilinas são, como outras proteínas de armazenamento, gradualmente degradadas durante a germinação e o crescimento das plântulas. Estudos recentes indicaram que as vicilinas desempenham um papel defensivo em sementes, como as vicilinas de sementes de *Vigna unguiculata* resistentes a bruquídeos, que se ligam fortemente à estruturas quitinosas presentes no intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus* (FIRMINO *et al.*, 1996; SALES *et al.*, 1996, 2001).

Recentemente, Rose *et al.* (2003) observaram que vicilinas de *Vigna unguiculata* resistentes, com propriedades de ligação à quitina, se ligavam à N-acetilglicosamina, glicosamina e triacetil-quitotriose, e que a associação de vicilinas a organismos que contêm quitina e outros glicoconjugados, podia ser revertida quando estes carboidratos eram colocados na dieta das larvas. Uchôa *et al.* (2006) mostraram que vicilinas permaneciam intactas em diferentes órgãos internos de

larvas e adultos do gorgulho *Calosobruchus maculatus*, quando estes foram alimentados com sementes de *Vigna unguiculata* resistente ao bruquídeo, o que provocava os efeitos deletérios observados anteriormente por Macedo *et al.* (1993) e Sales *et al.* (2001). Mota *et al.*, (2003) mostraram que vicilinas de *Vigna unguiculata* resistentes também foram eficazes contra larvas de *Diatraea saccharalis*, uma praga da cana-de-açúcar.

Estas propriedades observadas em vicilinas oriundas de sementes resistentes de *Vigna unguiculata* foram estendidas a outras vicilinas de sementes de leguminosas selvagens por Moura *et al.* (2007). Estes autores purificaram vicilinas de sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, que apresentaram uma massa molecular de 151 kDa, e observaram o efeito desta proteína como bioinseticida contra *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* e atividade antifúngica contra *Fusarium solani* e *Colletrichum lindemuntianum*. A vicilina foi eficaz como bioinseticida e foi mais resistente à degradação pelas enzimas digestivas de *Z. subfasciatus*, bem como inibiu a germinação de *F. solani*, provavelmente devido à ligação da quitina da parede do fungo.

Vicilinas e inibidores de enzimas digestórias são proteínas bioativas importantes nos processos de defesa de muitas espécies de plantas. Essas proteínas possuem atividades diversas sobre pragas e patógenos, ou inibindo enzimas ou se associando à estruturas do epitélio e membranas peritróficas presentes no intestino de vários insetos. Essas proteínas podem ser usadas como aleloquímicos no controle de pragas importantes, seja como constituinte tóxico de iscas ou nos programas de melhoramento de plantas cultivadas por meio de técnicas de transgenia.

Neste estudo, o sistema digestório do Lepidoptera *Plodia interpunctella* (praga de grãos armazenados) foi avaliado quanto a presença e classes mecanísticas de enzimas proteolíticas e quanto a presença de membrana peritrófica (quitina). Estes potenciais alvos foram usados para estabelecer estratégias de controle desta praga, utilizando sementes artificiais contendo: (1) vicilinas de sementes de *Erythrina velutina* (mulungu) e (2) Inibidor de tripsina de soja (SBTI), como modelos de controle da população destes insetos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Investigar alvos para proteínas bioativas vegetais em ensaios *in vitro* e *in vivo* em larvas de *Plodia interpunctella*.

Objetivos específicos:

- Detectar e caracterizar mecanisticamente as enzimas proteolíticas digestórias durante o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*;
- Avaliar o efeito, *in vivo*, de vicilina de sementes de *E. velutina* e SBTI sobre o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*;
- Identificar o mecanismo de ação da vicilina isolada (EvV) através de ensaios de imunohistoquímica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1 – Insetos

As larvas de *Plodia interpunctella* (Figura 1) foram obtidas da criação mantida no Laboratório de Moscas-das-frutas do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN.

3.1.2 – Proteínas utilizadas nos bioensaios

Sementes *Erythrina velutina* (mulungu) foram adquiridas no IBAMA localizado na cidade de Nísia Floresta (Rio Grande do Norte). Vicilina purificada foi cedida por Leonardo Lima Pepino de Macêdo. SBTI (tipo Kunitz) foi adquirido comercialmente (Sigma).

3.1.3 – Animais

Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia brancos para a produção de anticorpos contra vicilina de mulungu.

3.1.4 – Reagentes

Acrilamida e N’N’-metilenobisacrilamida (Amersham Biosciences);

Albumina sérica bovina (Sigma, USA);

Azocaseína e Hemoglobina (Sigma, USA);

Ácido tricloroacético (Sigma, USA);

Coomassie Brilliant Blue – R250 (BioRad)

TEMED (Merck)

SDS - Dodecil sulfato de sódio (Reagen)

Inibidores (Sigma, USA)

Os demais reagentes foram de grau analítico e adquiridos comercialmente.

3.1.5 – Equipamentos

Agitador magnético Tecnal TE-081

Balança analítica eletrônica Tecnal

Banho-maria Tecnal TE 56

Bomba Pump-1 Amersham Biosciences

Centrífuga Hitachi CR 21

Coletor de frações Radifrac Pharmacia Biotech

Espectrofotômetro Ultrospec 2100

Microcentrífuga Eppendorf 5410

Lupa Olympus

Microscópio de fluorescência

Sistema de eletroforese vertical BioRad

Sistema de eletroforese vertical Amersham Biosciences

Sistema de transferência para Western blot BioRad

3.2 - Métodos

3.2.1 - Criação de *Plodia interpunctella*

A criação de *P. interpunctella* foi mantida no Laboratório de Moscas-das-frutas do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte em um fotoperíodo de 12:12 horas, temperatura de ± 25 °C e umidade relativa de 60-70%. As larvas foram alimentadas com dieta artificial (Tabela 4), adicionada de bagaço de cana-de-açúcar a fim de se obter uma consistência pastosa sendo submetida, em seguida, a um processo de desidratação, permanecendo nesta até o período de pré-pupa em recipientes plásticos com abertura superior. A abertura encoberta com tecido e lacrada com elásticos de borracha. Após a emergência as mariposas foram alojadas em garrafas plásticas, de onde os ovos foram retirados com o auxílio de uma tela e colocados em contato com a dieta.

Tabela 4. Composição da dieta artificial de *P. interpunctella*

Componente	(g)
Farinha de trigo	380
Açúcar branco	360
Açúcar mascavo	120
Levedura	400
Benzoato de sódio	12
Água destilada	2276
HCl	36

3.2.2 - Determinação do número de ínstares larvais

O início da coleta de larvas para a construção da curva de ínstares se deu a após 24 horas posteriores ao início da oviposição. As larvas foram coletadas a cada 24 horas e terminando no início do empupamento, com o auxílio de uma lupa e pinças entomológicas e armazenadas em tubos de microcentrífuga contendo solução fixadora (Solução de Pampel: 420 mL Água destilada; 440 mL álcool; 80 mL

Formaldeído a 5%; 60 mL Ácido acético). Após término da coleta, iniciou-se a medição das cápsulas cefálicas das larvas fixadas usando o programa Image Tool (3.0). Em seguida foi construída uma curva de ínstaes e determinado o número e a duração dos estágios larvais.

3.2.3 - Dissecação das larvas

As larvas de primeiro e segundo ínstaes foram decapitadas e armazenadas em tubos de microcentrífuga contendo 200 μ L de solução salina. As larvas de terceiro, quarto, quinto e sexto ínstaes foram mergulhadas em solução salina, dissecadas a frio, com o auxílio de uma lupa, e o trato intestinal das larvas seccionado foi exposto utilizando pinças e transferido para tubos de microcentrífuga contendo solução salina. Todos os materiais coletados foram mantidos a -20°C , até a extração do homogenato intestinal e utilização nos ensaios de atividade enzimática.

3.2.4 – Preparo de extratos intestinais de larvas

O homogenato intestinal foi preparado seguindo a metodologia estabelecida por Terra *et al.* (1977), com algumas modificações. Os intestinos das larvas dos insetos foram homogeneizados com auxílio de um pistilo em tubos de microcentrífuga, em banho de gelo, por aproximadamente 10 minutos, usando-se como extrator 800 μ L de seus respectivos tampões. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10000xg durante 15 minutos à temperatura de 4°C . Os sobrenadantes obtidos foram utilizados posteriormente nos ensaios de atividade enzimática e inibitória.

3.2.5. – Ensaio de atividade proteolítica de homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*

3.2.5.1 - Preparo de Solução de Azocaseína a 1,5%

Cerca de 1,5 g de azocaseína foi adicionada a 100 mL dos tampões Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; Tris-HCl 0,05 M pH 9,5 e Acetato de Sódio 0,01 M pH 5,5. A mistura foi aquecida por 10 min a 100 °C. Após o resfriamento o volume foi ajustado com água destilada e armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

3.2.5.2 - Determinação da Atividade Azocaseinolítica

A atividade azocaseinolítica foi detectada por incubação de 50 µl de homogenato intestinal com 450 µl de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; Tris-HCl 0,05 M pH 9,5 e Acetato de Sódio 0,01 M pH 5,5, respectivamente, e 500 µl de solução de azocaseína 1,5% por 30 min, a 37 °C. A reação foi paralisada com 150 µl de TCA 20%. Transcorridos 30 min, a suspensão foi centrifugada por 15 min, a 12000 x g à temperatura ambiente. Aliquotas de 800 µl do sobrenadante foram alcalinizadas com 800 µl de NaOH 2N. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e provas em branco foram realizadas. A atividade azocaseinolítica foi medida pela absorbância dos peptídeos diazotizados produzida a 440 nm. Essa atividade foi considerada como sendo uma unidade de atividade correspondente à quantidade de enzima que produz uma absorbância de 0,01 D.O. a 440 nm em um volume de 1 ml nas condições do ensaio.

3.2.5.3 - Preparo de Solução de Hemoglobina a 1%

Pesou-se 1g de hemoglobina, que foi dissolvida em 50 ml de HCl 0,06 N, adicionando-se em seguida 40 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 3,5. O pH

da solução foi ajustado e o volume completado para 100 ml com o mesmo tampão. Esta solução foi mantida em geladeira por um período máximo de uma semana.

3.2.5.4 - Determinação da Atividade Hemoglobínica

A atividade hemoglobínica foi determinada seguindo o método descrito por Coelho (1980), com algumas modificações. Alíquotas de 100 μ l de homogenato intestinal, 50 μ l de tampão Acetato de Sódio 0,2 M pH 3,5 e 500 μ l de hemoglobina 1% foram incubados por uma hora a 40°C. A reação foi parada com 100 μ l de solução de TCA 40%, deixada em repouso por 30 min e, em seguida, centrifugada por 15 minutos a 12000xg, à temperatura ambiente. Alíquotas de 500 μ l do sobrenadante foram alcalinizadas com 500 μ l de NaOH 2N. O método de Folin modificado por Lowry (1951) foi adotado para determinação dos peptídeos solúveis em TCA. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e provas em branco foram realizadas. A atividade hemoglobínica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma leitura de 0,01 D.O. a 750 nm em um volume de reação de 650 μ l nas condições do ensaio.

3.2.6 – Efeito do pH sobre a atividade azocaseinolítica do homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto instares.

O efeito do pH foi avaliado utilizando os seguintes tampões: Tampão Acetato de Sódio 0,2 M pH 4,5; Tampão Acetato de Sódio 0,1 M cisteína 1 mM, EDTA 3 mM pH 5,5; Tampão Acetato de Sódio 0,2 M pH 6,5; Tampão Tris-HCl pH 7,5 – 11,5. As soluções de azocaseína 1,5% foram preparadas de acordo com o pH utilizado no ensaio. Os ensaios foram realizados de acordo como descrito anteriormente.

3.2.7 – Efeito da temperatura sobre a atividade azocaseinolítica a pH 9,5

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com o descrito anteriormente. As temperaturas de incubação utilizadas foram 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C.

3.2.8 – Determinação das classes mecanísticas das enzimas proteolíticas de homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto ínstares

Inibidores de proteinases serínicas (SBTI 1 mM, PMSF 1 mM, TPCK 0,1 mM e TLCK 0,1 mM), cisteínicas (E-64 0,01 mM e Iodoacetamida 0,1 mM) e metaloproteinases (EDTA 0,01 M e 1,10-Fenantrolina 0,1 mM) foram utilizados para determinação das classes mecanísticas das enzimas presentes nos homogenatos intestinais de *P. interpunctella*. Para a avaliação da inibição para proteinases serínicas o pH de ensaio foi 7,5. Os ensaios de inibição de atividade cisteínica foram realizados em pH 5,5 e os inibidores de metaloproteinase foram ensaiados a pH 9,5.

No ensaio, 20 µL de homogenato de larvas de terceiro ínstar e 5µL de larvas de sexto ínstar foram incubados juntamente com os inibidores na concentração especificada. Enzima e inibidor permaneceram em contato durante 15 minutos a 37 °C, logo após foram realizados os ensaios, seguindo a metodologia descrita acima.

3.2.9 - Ensaio da Atividade em Gel de Poliacrilamida com SDS

A metodologia desenvolvida por Laemmli (1970) foi utilizada para caracterizar o perfil eletroforético das enzimas do homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*. Foram utilizadas placas de vidro com dimensões 8,3 x 10,1cm e 7,3 x 10,1cm, e espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado com 3,75 ml de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,875 ml de tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8; água

destilada (1,762 ml), 75 µl de SDS 10%; 3,5 µl de TEMED concentrado e 37,5 µl de solução de persulfato de amônio 30%. O gel de concentração continha 0,267 ml de acrilamida-bisacrilamida 30%; 501 µl de tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 1,2 ml de água destilada; 20 µl de SDS 10%; 2 µl de TEMED concentrado e 10 µl de persulfato de amônio 30%. As amostras foram misturadas com Tampão de amostra (azul de bromofenol 0,002%, SDS 2% e sacarose 10%). O tampão de corrida continha 0,025 M de trizma-base, 0,192 M de glicina, SDS 1,0%. Os zimogramas foram realizados de acordo com García-Carreño & Haard (1993), onde a corrida eletroforética foi processada a 5°C, sob corrente constante de 30 mA, por aproximadamente 2 horas. Após o marcador de corrida atingir o final do gel a eletroforese foi interrompida. O gel de poliácridamida foi submetido a uma lavagem com Triton x-100 a 2,5% por 30 minutos e três lavagens com água destilada por 2 minutos. Em seguida, o gel foi imerso em 30 mL de uma solução de azocaseína 2,5 % dissolvida em Tris-HCl 0,05 M no pH apropriado incubado por 30 minutos a 4 °C. Em seguida, foi incubado com Tampão Tris-HCl 0,05 M no pH apropriado a 37 °C. Após 30 minutos o gel foi submetido a uma rápida lavagem com água destilada e, em seguida, ao coramento com Coomassie Blue R-250 para visualização das bandas.

3.2.10 - Detecção de quitina no intestino médio de larvas de *P. interpunctella*

O intestino de larvas foi perfurado, o conteúdo do lúmen foi aspirado e reservado. O intestino foi então lavado para a remoção de conteúdos luminais remanescentes. A presença de quitina foi verificada através do teste de von Wisselingh (ROGER & PERKINS, 1968). Este teste qualitativo detecta quitosana produzida após tratamento térmico do material contendo quitina, com NaOH

saturado por 15 min a 160°C. Resíduos foram lavados com diferentes concentrações de álcool etílico: 10, 20, 30, 40, 80 e 95%. Após a reação, a presença de quitina foi observada com solução de lugol e, em seguida, ácido sulfúrico a 1%. Controle positivo foi feito utilizando quitina de lagosta e para o negativo foi utilizado celulose.

3.2.11 – Efeito de SBTI e EvV sobre larvas de *Plodia interpunctella* em um sistema de dieta artificial

SBTI e vicilina de *E. velutina* foram avaliadas separadamente quanto ao seu efeito tóxico ou deletério sobre larvas de *P. interpunctella* em um sistema de dieta artificial. A dieta com a adição das proteínas testadas neste bioensaio, somando um peso de 800 mg, foi alojada no interior de cápsulas gelatinosas transparentes de tamanho 0,3. Três larvas neonatas foram transferidas para o interior das cápsulas. Os tratamentos consistiram de seis tubos contendo três cápsulas cada. As proteínas foram adicionadas à dieta nas seguintes proporções 0,2; 0,5; 1; 2; 4 e 8% do peso total da dieta para o bioensaio utilizando vicilina e de 0,2; 0,5; 1; 2 e 4% quando foi utilizado SBTI. A WD_{50} e a LD_{50} dos inibidores foram mensurados por curva de regressão.

3.2.12 - Mecanismo de ação de vicilinas de *Erythrina velutina*

3.2.12.1. - Digestibilidade *in vivo* de EvV pelas larvas de *P. interpunctella*

- **Ensaio de digestibilidade *in vivo* de EvV pelas larvas**

Aproximadamente 300 larvas em quinto ínstar de *P. interpunctella* foram alimentadas com uma dieta composta de amido e açúcar acrescida de vicilina de *E. velutina* em uma concentração de 0,5% em relação ao peso total da dieta. As larvas foram mantidas durante 4 horas nesta dieta e, em seguida, removidas para uma

dieta sem vicilina. As fezes foram coletadas por peneiração e as proteínas presentes foram extraídas utilizando Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 através de centrifugações consecutivas (12000 xg), por fim, o precipitado foi descartado. O sobrenadante foi utilizado em SDS-PAGE e western blotting. As larvas utilizadas como controle foram alimentadas unicamente com dieta composta por amido, açúcar e albumina sérica bovina.

- **Produção de anticorpos contra EvV**

Um coelho de três meses de idade foi imobilizado e sangrado através de corte na extremidade da orelha feito com bisturi cirúrgico, para obtenção do soro pré-imune. Após a coleta de 5ml de sangue este material foi deixado em repouso por toda a noite a 5°C. O soro foi separado do coágulo formado, centrifugado para clarificar e reservado a -20°C.

Após a obtenção do soro pré-imune, amostras de EvV foram preparadas a uma concentração de 1mg/mL em solução salina, NaCl 150 mM. Este material foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (ACF) na proporção 1:1 (solução de EvV: adjuvante). Após 30 dias, novas aplicações de antígenos emulsificados em adjuvante incompleto de Freund (AIF) foram realizadas regularmente. O protocolo utilizado para imunização do coelho segue abaixo:

1° dia – imunização subcutânea do antígeno + ACF (0,4 mL)

30° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,4 mL)

60° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,4 mL) + 1° sangria

90° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,4 mL) + 2° sangria

120° dia – imunização subcutânea do antígeno + AIF (0,4 mL) + 3° sangria

A obtenção e estocagem do soro após imunização seguiram o mesmo procedimento do soro pré-imune. Reforços foram aplicados semanalmente e antissoros obtidos regularmente.

As amostras de soros obtidas foram passadas em uma coluna de proteína A-Sepharose previamente equilibrada com tampão NaH_2PO_4 0,02 M pH 8,0, 150 mM NaCl. O material não adsorvido foi eluído com tampão de equilíbrio. A eluição de IgGs adsorvidos na coluna foi realizada com tampão Na_2HPO_4 50 mM, ácido cítrico 25 mM, pH 3,0. As IgG isoladas foram neutralizados com NaOH 0,1 M, dialisadas contra água destilada e liofilizados. Soluções estoques de IgG foram preparadas em PBS pH 7,5, BSA 2% na concentração de 10 mg/mL. Os anticorpos assim obtidos foram utilizados para o western blotting. O título do anticorpo foi estabelecido pela técnica de “dot-blot”.

- **Deteção por imunoblot de vicilinas ou produtos da hidrólise de EvV pelas larvas**

O método de “imunoblotting” representa uma combinação das técnicas de eletroforese e imunodeteção de proteínas, com o objetivo de visualizar a especificidade de interação antígeno/anticorpo por meio de uma imunoreação (TOWBIN *et al.*, 1979).

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, os géis foram retirados das placas e equilibrados em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8,0 v/v). Membranas de nitrocelulose e papéis de filtros Whatman 3 mm foram cortados no tamanho dos géis. As membranas foram também equilibradas com tampão de transferência por 5 minutos. Em uma bandeja de vidro foi montado um “sanduíche” que tinha a seguinte ordem de empilhamento: primeiro

foi colocado o suporte plástico do aparelho de transferência, seguido de uma esponja, três folhas de papel de filtro, o gel de eletroforese, a membrana de nitrocelulose e por último, mais três folhas de papel de filtro, esponja e outro suporte de plástico (Figura 2). Entre o gel e a membrana teve-se o cuidado de retirar bolhas de ar que poderiam interferir na transferência das proteínas. O “sanduíche” foi comprimido pelos suportes plásticos que se conectavam, colocado em uma cuba de eletrotransferência (célula comercial Transblot) e imerso em tampão de transferência. A eletrotransferência foi feita por 90 minutos com uma corrente constante de 200 mA a 4°C. Após transferência o “sanduíche” foi desfeito e a membrana, retirada cuidadosamente, foi corada com Vermelho de Ponceau 2%, para se verificar a eficiência da transferência.

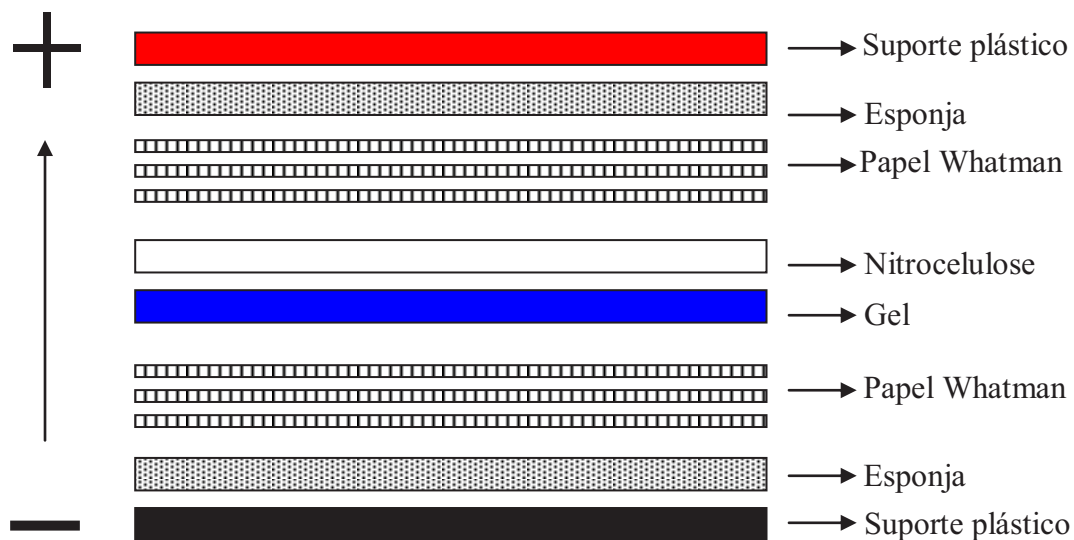


Figura 2. Esquema de montagem do “sanduíche” para eletrotransferência de proteínas de gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose.

A imunodeteccção das proteínas seguiu o procedimento descrito por Towbin et al., 1979:

1. Bloqueio dos sítios não específicos na membrana com tampão bloqueador (tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, leite desnatado 2%, pH 7,4) permanecendo nesta solução por 1 hora;
2. Lavagem da membrana com tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 por 6 vezes, cada lavagem com duração de 10 minutos;
3. Reação com o anticorpo primário. Os anticorpos anti-EvV foram utilizados na titulação 1:2000. Todos os anticorpos foram diluídos em bloqueador, e as membranas imersas nestas soluções por 1 hora;
4. Repetição do item 2;
5. Reação com o anticorpo secundário. HRP-anti-IgG de coelho foi diluído em tampão bloqueador (1:5000) e a membrana imersa nesta solução por 1 hora;
6. Repetição do item 2;
7. Visualização da reação imunológica. As bandas protéicas imunoreativas para EvV foram reveladas por uma reação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). As membranas foram imersas em uma solução contendo 5mg de DAB dissolvidos em 4,9 mL de água destilada, 0,3 mL de imidazol 0,1M, 0,1mL de tampão Tris-HCl 2M pH 7,5 e 5 mL de H₂O₂ a 30% (4°C). As membranas ficaram imersas nesta solução por 10 minutos ou até aparecerem bandas coradas em marrom.
8. Provas em branco com soro pré-imune foram incluídas.

3.2.13 – Detecção de EvV-FITC em membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella*

3.2.13.1 - Conjugação covalente de EvV-FITC

Para a conjugação da proteína com FITC, 200 mg de EvV foram dissolvidos em tampão carbonato 0,5 M, pH 9,5, numa concentração final de 2 mg/mL. A conjugação foi realizada de acordo com Johnston *et al.* (1973). Um mililitro da solução de FITC (20 mg/mL em DMSO) foi adicionado à solução de vicilina em uma proporção final de 0,1 mg FITC/ mg de EvV. A mistura foi armazenada em um frasco escuro e agitada levemente por 1 hora à temperatura ambiente. O FITC não reativo foi removido por precipitação da vicilina com sulfato de amônio 0-90% de saturação. O precipitado foi dialisado exaustivamente contra água e liofilizado.

3.2.13.2 – Localização fluorescente de EvV-FITC na membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella* e ensaio de inibição de ligação com N-acetil D-glicosamina

Para verificar a ligação de EvV em estruturas quitinosas de *P. interpunctella*, o EvV-FITC foi adicionado à dieta dos insetos a uma concentração de 0,5% (m/m). As larvas foram alimentadas com a dieta contendo vicilina marcada por 3 horas, e por mais 3 horas em dieta sem vicilina. Após esse período as larvas foram dissecadas para a separação das membranas peritróficas. As membranas peritróficas foram submetidas a 10 lavagens em tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 7,5; 5 minutos cada; para a retirada de EvV-FITC livre remanescente. Para o ensaio de inibição da ligação, a dieta contendo EvV-FITC foi complementada com 2,5% (m/m) de N-acetil D-glicosamina. Os controles foram feitos utilizando BSA na mesma concentração de EvV-FITC, controles contendo somente EvV não marcada, N-acetil D-glicosamina e FITC também foram realizados.

3.2.14 - Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software STATISTICA 7.0. Este programa foi empregado para a realização de teste ANOVA e teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção e caracterização das classes mecanísticas das enzimas proteolíticas alvos envolvidas nos processos digestórios durante o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*

4.1.1 - Determinação do número dos estágios larvais

Para a determinação do número de estágios, as larvas foram coletadas a partir da eclosão e armazenadas em tubos de microcentrífuga, contendo solução fixadora. As larvas foram coletadas desde a fase neonata até o início da fase de pupa. Em seguida, as cápsulas cefálicas foram medidas através do programa ImageTool (Versão 3.0). Os resultados obtidos permitiram que se estabelecesse o número de fases larvais (ínstares) que esse inseto-praga passa até atingir o estado de pré-pupa (Tabela 5). Nas condições de temperatura de ± 25 °C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12 (L:E), as larvas de *P. interpunctella* apresentaram cinco ínstares bem diferenciados.

Tabela 5. Medida das cápsulas cefálicas durante o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*

Número de ínstares	Média (mm)
1º	0,16 \pm 0,02
2º	0,25 \pm 0,05
3º	0,40 \pm 0,09
4º	0,59 \pm 0,03
5º	0,87 \pm 0,03
6º (Pré-pupa)	0,87 \pm 0,03

4.1.2 - Detecção das atividades proteolíticas no homogenato intestinal (HI) durante o desenvolvimento larval

Estabelecido os ínstares larvais, as atividades proteolíticas presentes nos homogenatos intestinais das larvas foram detectadas, utilizando os substratos azocaseína e hemoglobina a diferentes pHs. As atividades enzimáticas detectadas por intestino sobre azocaseína foi maior a pH 9,5, seguido pela atividade a pH 7,5, sendo detectado atividade residual a pH 5,5. O pico de atividade por intestino a pH 7,5 foi observado nas larvas do quinto ínstar e a pH 9,5 nas larvas do pré-pupa

(Figura 3A). Essas atividades foram também mensuradas por proteína intestinal e foi observado que a atividade específica a pH 7,5 foi baixa e o pico detectado nas larvas do quarto ínstar. A atividade específica sobre azocaseína a pH 9,5 foi a mais alta e detectada em larvas do terceiro ínstar (Figura 3B). Utilizando hemoglobina a pH 3,5 pode ser observada a ocorrência de um pico de atividade ácida específica no primeiro estágio larval, no entanto uma atividade residual foi detectada por intestino durante o desenvolvimento larval.

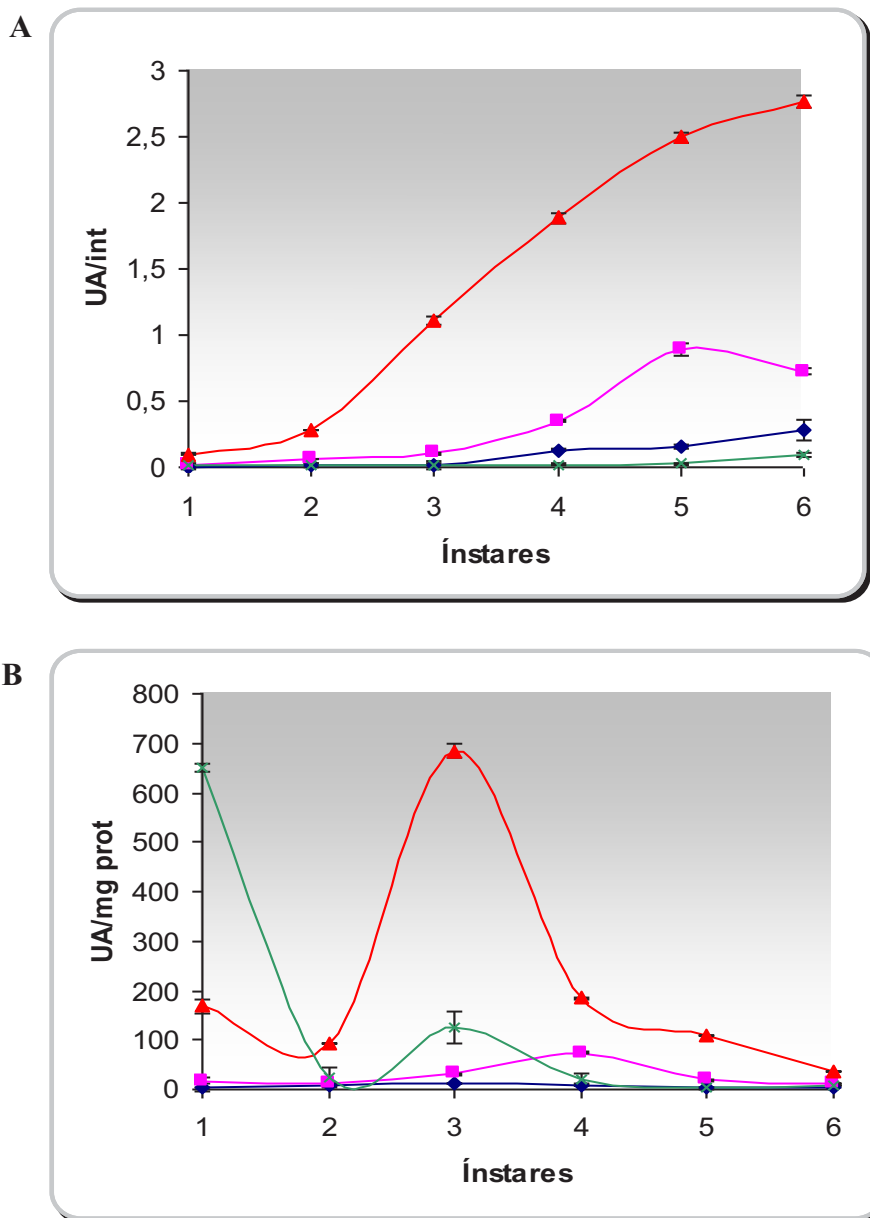


Figura 3. Detecção das atividades proteolíticas no homogenato intestinal durante o desenvolvimento larval. (A) Atividade proteolítica por intestino larval; (B) Atividade proteolítica específica por intestino larval. Atividade azocaseinolítica a pH 5,5 (◆), pH 7,5 (■), pH 9,5 (▲); Atividade hemoglobinasica a pH 3,5 (*).

4.1.3 - Determinação do pH ótimo das atividades proteolíticas presentes no Homogenato intestinal (HI) de larvas de terceiro ínstar e pré-pupa

As curvas de atividades enzimáticas das larvas de terceiro e sexto ínstares foram semelhantes mostrando que as enzimas presentes nos homogenatos intestinais foram ativas na faixa de pH básico e mostraram um pH ótimo a 9,5 e atividade estável entre pHs 10 a 11,5 (Figuras 4A e 4B).

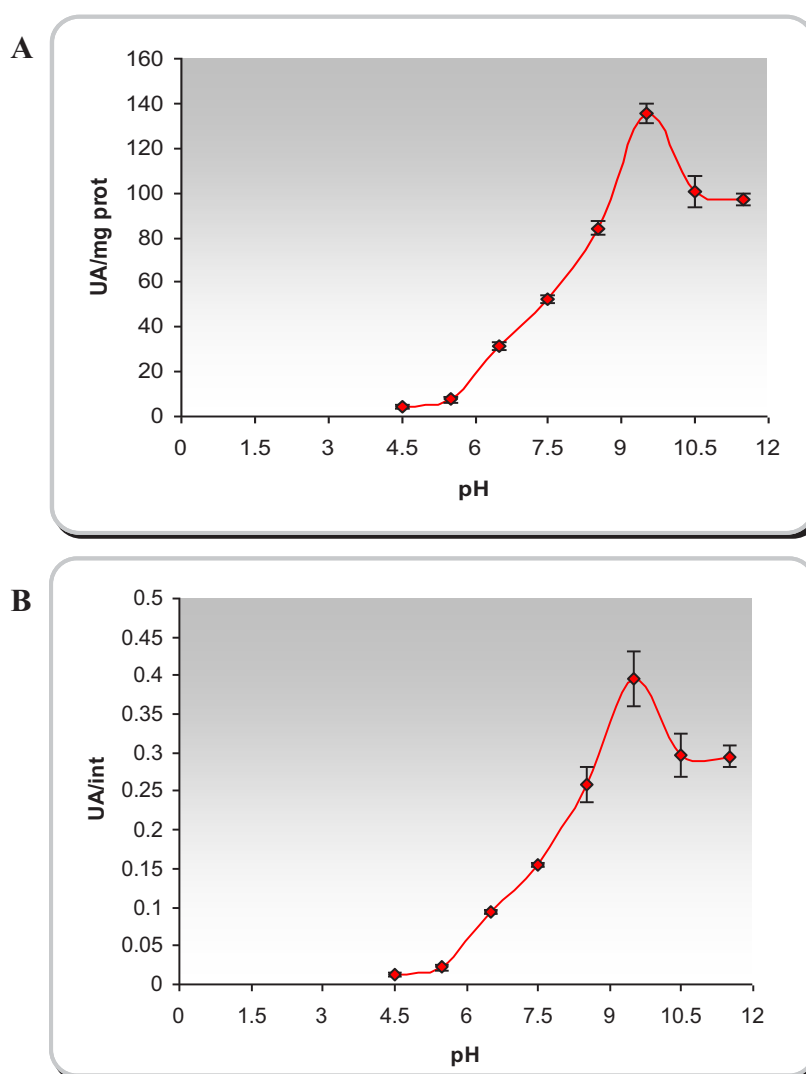


Figura 4. Curva de pH para a detecção do pH ótimo para atividade das enzimas proteolíticas presente no HI de larvas de (A) terceiro e (B) sexto ínstares de *P. interpunctella*. Nos ensaios foram utilizadas alíquotas de 50 μ L de homogenato intestinal.

4.1.4 - Determinação da temperatura ótima das atividades proteolíticas presentes no HI de larvas de terceiro e sexto instares

As enzimas presentes nos homogenatos intestinais de ambos os instares foram ativas na faixa de temperatura 40 a 60°C, com temperatura ótima de 50°C (Figuras 5A e 5B).

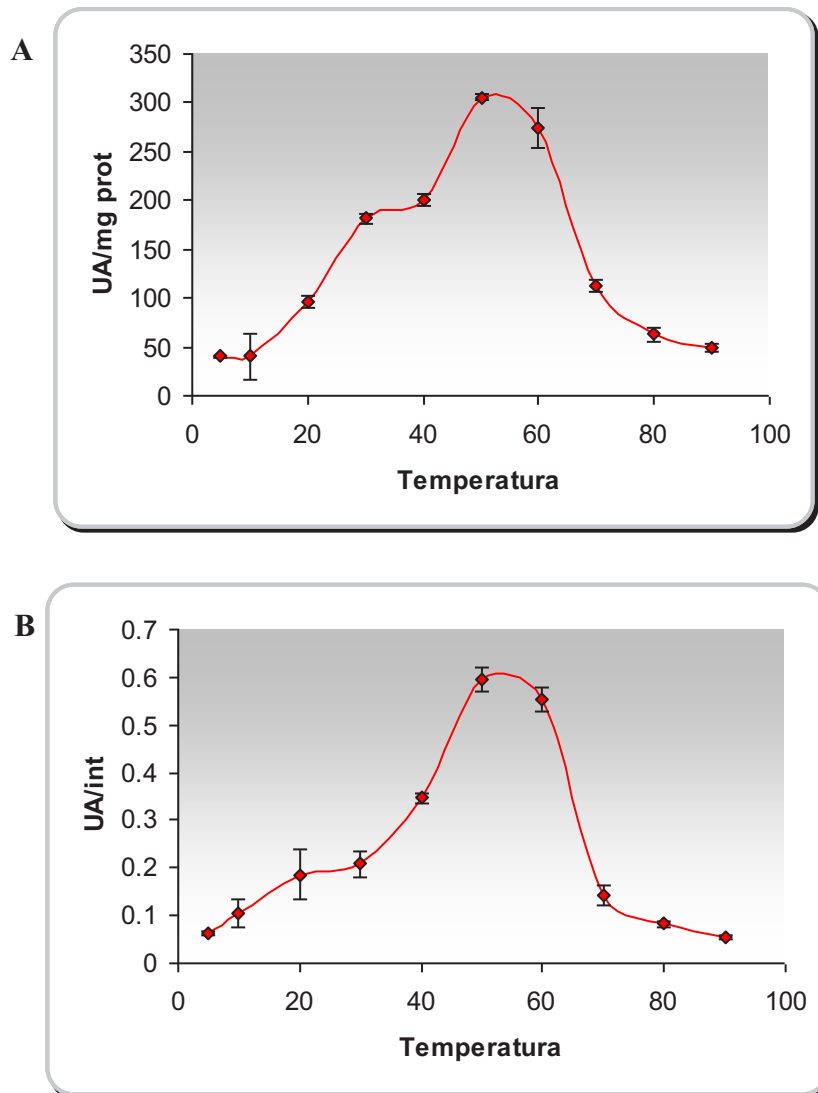


Figura 5. Curva de temperatura para a detecção da temperatura ótima de atividade para enzimas proteolíticas presente no HI de larvas de (A) terceiro e (B) sexto instares de *P. interpunctella* em pH 9,5. Alíquotas de 50 µL de homogenato intestinal foram utilizadas nos ensaios.

4.1.5 - Efeito de inibidores específicos de classes de enzimas proteolíticas sobre a atividade do homogenato intestinal de larvas de terceiro ínstar e pré-pupa

Inibidores de diferentes classes de enzimas proteolíticas foram utilizados para determinar as classes mecanísticas das enzimas presentes no homogenato intestinal das larvas. Os ensaios revelaram que enzimas presentes nos homogenatos intestinais foram fortemente inibidas a pH 9,5 por SBTI e TLCK e moderadamente inibidas por Iodoacetamida, E-64, EDTA e fenantrolina em larvas do terceiro e sexto ínstares. Esses resultados sugerem que larvas de *P. interpunctella* utilizam preponderantemente enzimas serínicas do tipo tripsina para digerirem as proteínas presentes em suas dietas. A contribuição, em menor escala, de enzimas do tipo cisteínicas e metaloproteínases sugere que estas são também encontradas nos homogenatos intestinais destas larvas (Figuras 6A e 6B).

4.1.6 - Caracterização por Zimograma das enzimas presentes no homogenato intestinal de larvas do terceiro e sexto ínstar

Nos zimogramas dos homogenatos intestinais de larvas de ambos os ínstares, utilizando azocaseína como substrato e inibidores de proteinases serínicas (Figuras 7A e 7B) foram observados diferentes padrões de atividade enzimática em número de bandas de atividades no gel. Larvas do terceiro ínstar apresentaram 2 grupos formado por duas bandas de atividade cada: um grupo de alta massa molecular e outro na faixa de baixa massa molecular. As duas atividades de baixa massa molecular foram totalmente inibidas por TLCK e apresentaram retardo nas atividades quando inibidas por SBTI. As larvas de sexto ínstar apresentaram 3 faixas de bandas de atividade, alta, média e baixa massas moleculares, contendo cada faixa cerca de 3 a 4 bandas de atividades enzimáticas para azocaseína a pH 9,5. Apenas TLCK inibiu 2 bandas de atividade enzimáticas no grupo de baixa massa molecular e essas atividades foram também retardadas pelo SBTI. Nos zimogramas onde os homogenatos foram incubados com inibidores de enzimas cisteínicas e metaloproteínases, não foram observados desaparecimento e nem retardo das bandas de atividades (Figura 8A e 8B).

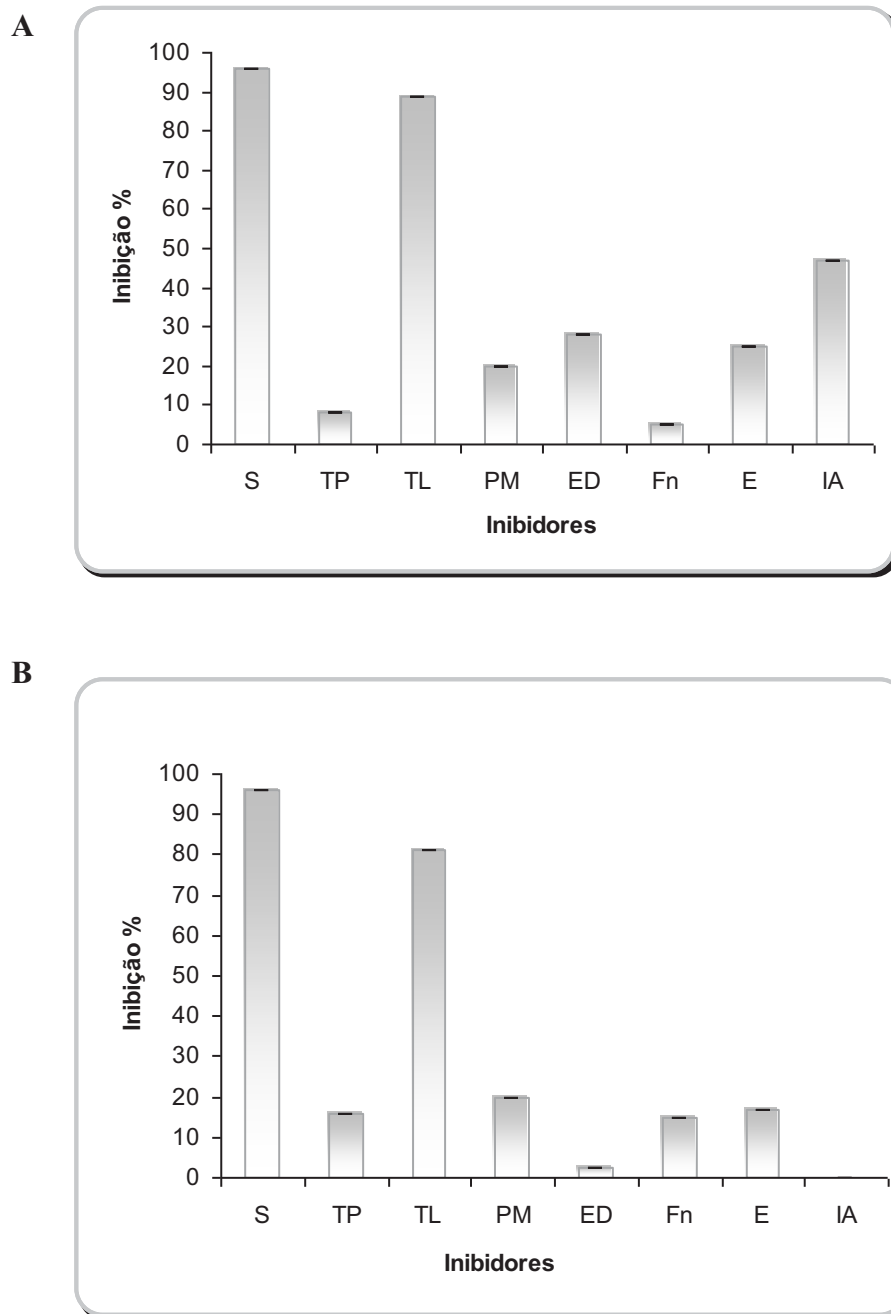


Figura 6. Efeito de inibidores específicos de classes mecânicas de enzimas proteolíticas sobre a atividade do homogenato intestinal de larvas de terceiro e sexto ínstar de *P. interpunctella*. Nos ensaios foram utilizadas alíquotas de 50 μ L de homogenato intestinal, realizado a 37 $^{\circ}$ C, pH 9,5. (A) Larvas do terceiro ínstar; (B) larvas do sexto ínstar. Proteinases serínicas: SBTI 1 mM (S), TPCK 0,1 mM (TP), TLCK 0,1 mM (TL) e PMSF 1 mM (PM); proteinases cisteínicas: E-64 0,01 mM (E) e Iodoacetamida 0,1mM (IA); metaloproteinases: EDTA 0,01 M (ED) e Fenantrolina 0,1 mM (Fn).

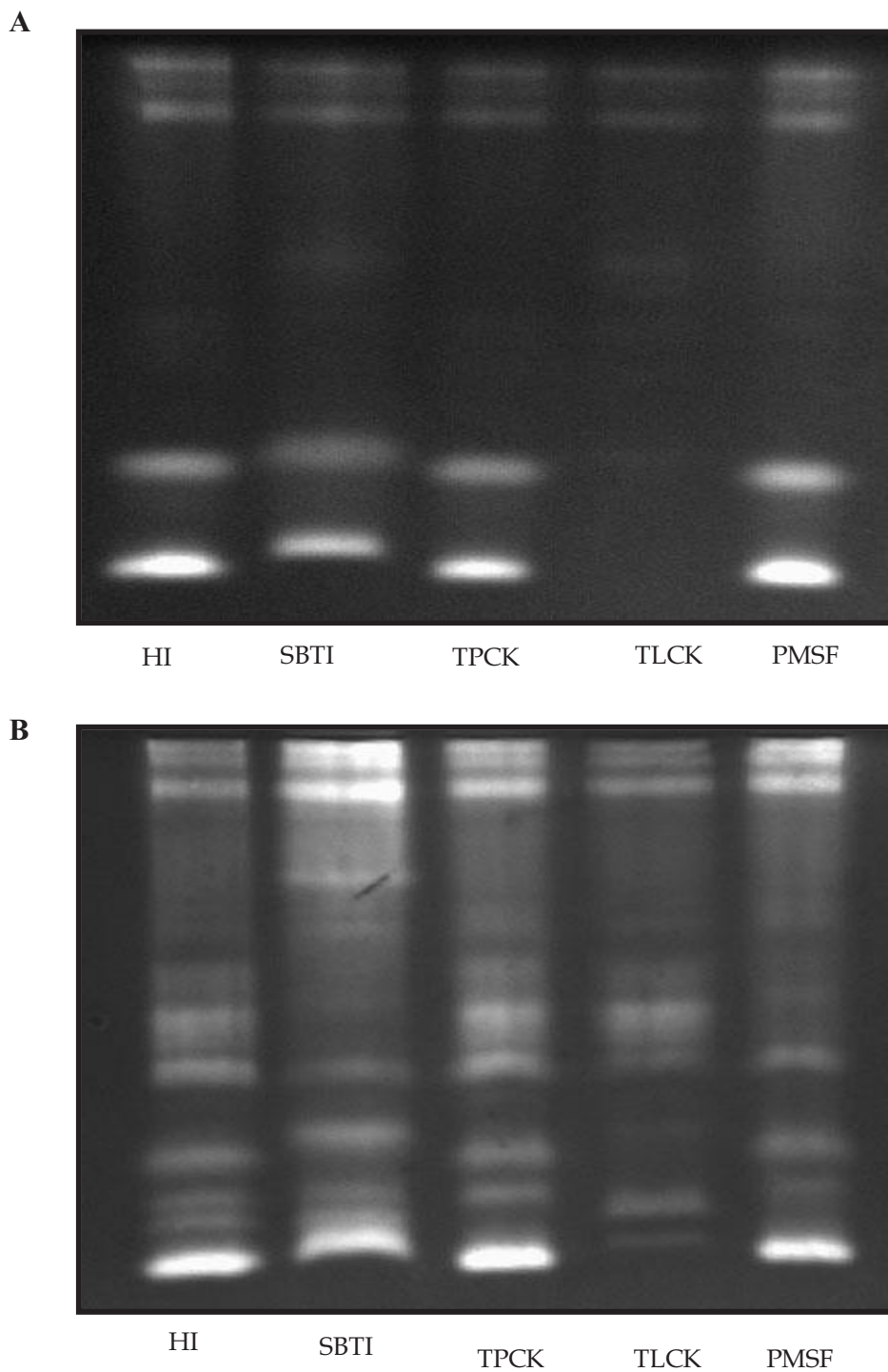


Figura 7. Zimograma do homogenato intestinal (HI) de larvas de *P. interpunctella* utilizando azocaseína como substrato a pH 9,5. Homogenato intestinal pré-incubado com diferentes inibidores de proteinases serínicas: SBTI, TPCK; TLCK e PMSF. (A) HI de larvas de terceiro ínstar; (B) HI de larvas de sexto ínstar.

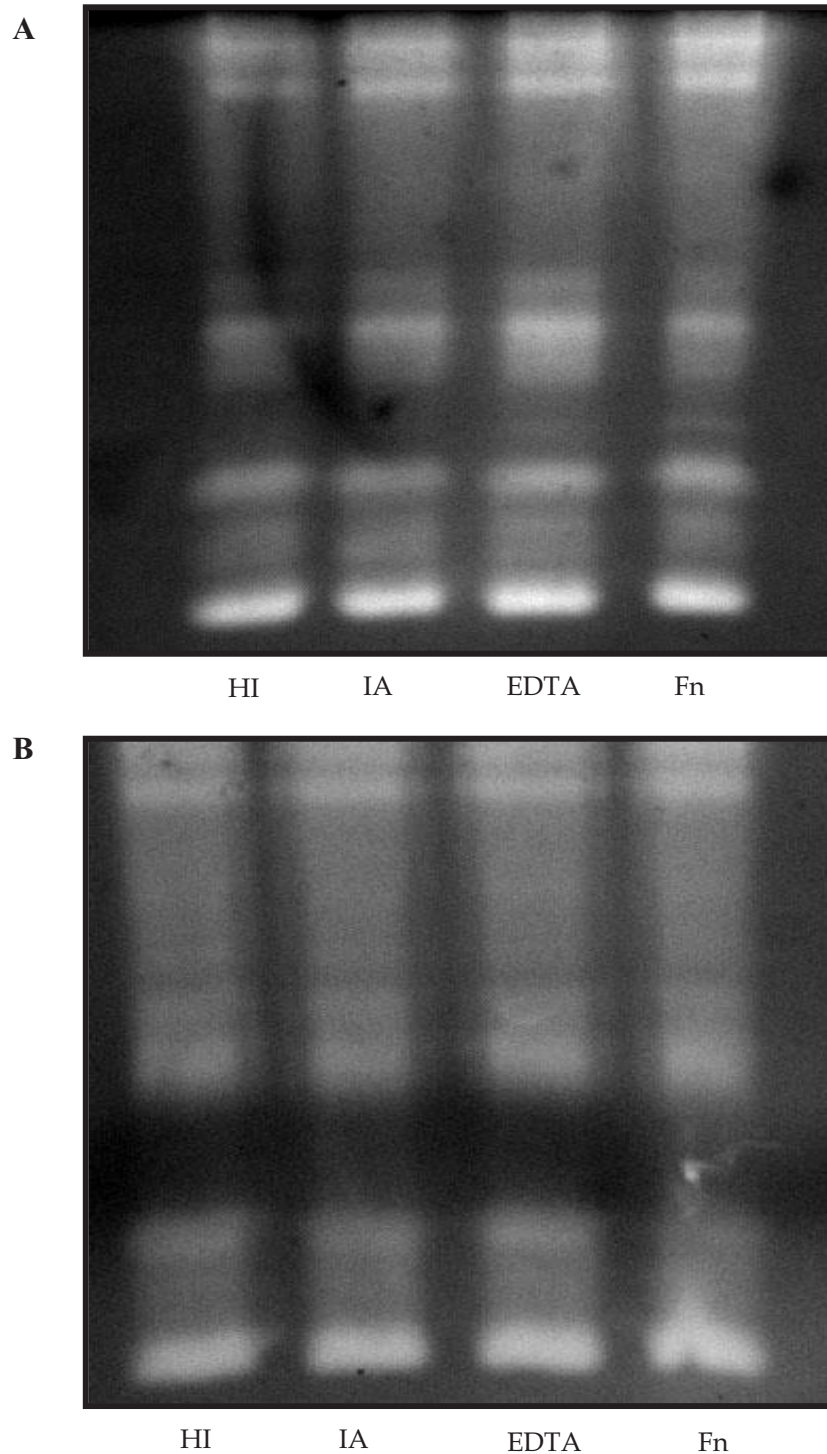


Figura 8. Zimograma do homogenato intestinal (HI) de larvas de *P. interpunctella* utilizando azocaseína como substrato a pH 9,5. Homogenato intestinal pré-incubado com diferentes inibidores de proteinases cisteínicas: IA (iodoacetamida); Metaloproteinases: Fn (Fenantrolina) e EDTA. (A) HI de larvas de terceiro ínstar; (B) HI de larvas de sexto ínstar.

4.2. Efeito do inibidor de tripsina de soja (SBTI) sobre as enzimas serínicas alvos do HI de larvas de *P. interpunctella*

Foi observado o efeito da incorporação de SBTI à dieta de *P. interpunctella* sobre o desenvolvimento das larvas. Dois parâmetros foram avaliados, a quantidade

de SBTI que reduzia o peso das larvas pela metade (WD_{50}) e a quantidade que reduzia a população das larvas pela metade (LD_{50}). As curvas doses-efeitos de SBTI indicaram que esta proteína de defesa não afetou a massa das larvas e nem o número de indivíduos durante o desenvolvimento desta praga (Figura 9A e 9B).

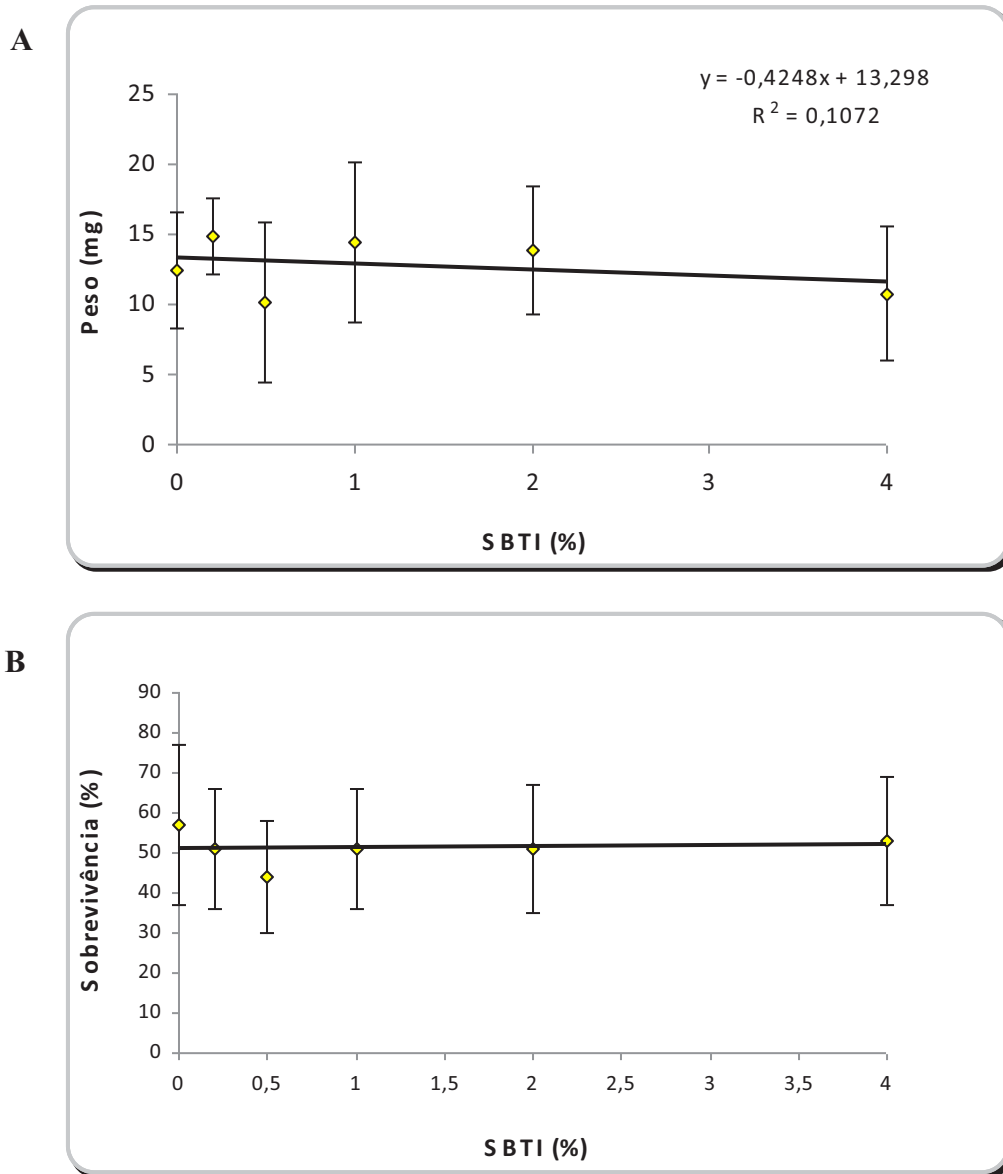


Figura 9. Efeito de SBTI adicionado à dieta durante o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*. (A) Curva dose resposta para determinação do WD_{50} ; (B) Curva dose resposta para determinação do LD_{50} . Letras iguais representam que não houve diferença significativa entre as concentrações para o Teste de Tukey, onde, $p < 0,05$.

Quando analisado, após o bioensaio, o efeito de SBTI sobre os ínstares larvais de *P. interpunctella* foi observada redução no desenvolvimento, onde houveram larvas que se desenvolveram até o terceiro ínstar quando alimentadas

com dieta contendo 4% de SBTI, o que diferiu para as outras concentrações (Figura 10).

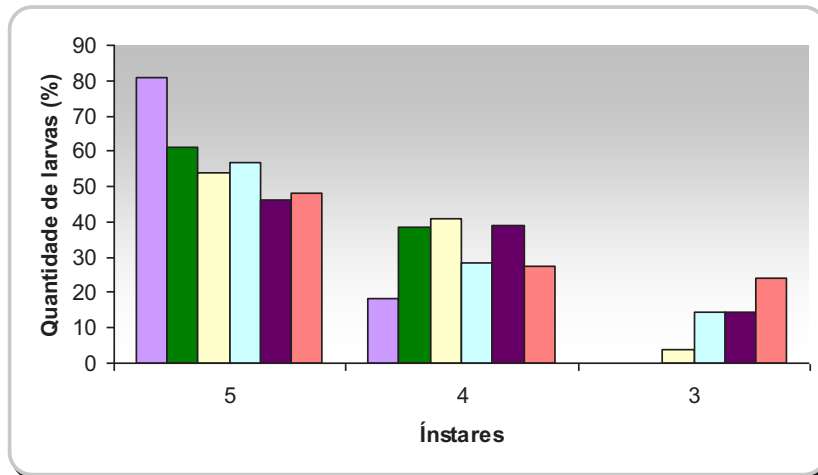


Figura 10. Efeito de SBTI sobre o número de ínstars de *P. interpunctella*. Controle (■); 0,2% (■); 0,5% (■); 1% (■); 2% (■); 4% (■).

4.3. Efeito da vicilina de *E. velutina* (EvV) sobre as larvas de *P. interpunctella*

EvV foi incorporado à dieta de *P. interpunctella* e observado seu efeito sobre o desenvolvimento das larvas. Dois parâmetros foram avaliados, a quantidade de EvV que reduzia o peso das larvas pela metade (WD_{50}) e a quantidade que reduzia a população das larvas pela metade (LD_{50}). As curvas doses-efeitos de EvV indicaram que esta proteína de defesa afetou a massa das larvas com WD_{50} de 0,27% e o número de indivíduos com LD_{50} de 0,23% durante o desenvolvimento desta praga (Figura 11A e 11B).

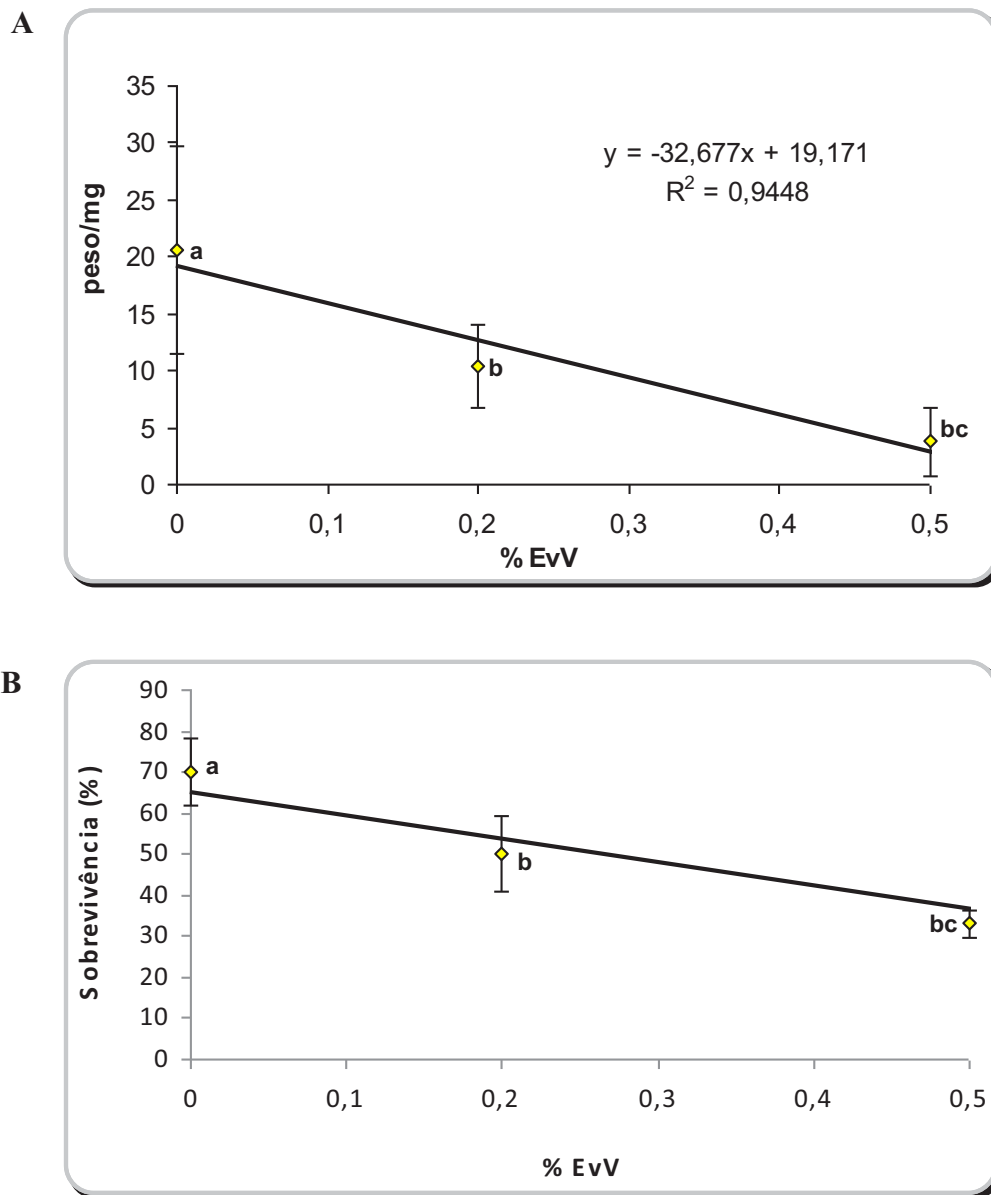


Figura 11. Efeito de EvV adicionado à dieta durante o desenvolvimento larval de *P. interpunctella*. (A) Curva dose resposta para determinação do WD50; (B) Curva dose resposta para determinação do LD50. Letras diferentes representam diferença significativa entre as concentrações para o Teste de Tukey, onde, $p < 0,05$.

Quando analisado o efeito de EvV em relação aos ínstares em que se encontravam as larvas de *P. interpunctella*, após o bioensaio, observamos que houve redução do número de ínstares, onde, as larvas alimentas com dieta adicionada de 1% de EvV alcançaram maior desenvolvimento até o segundo ínstar (Figura 12)

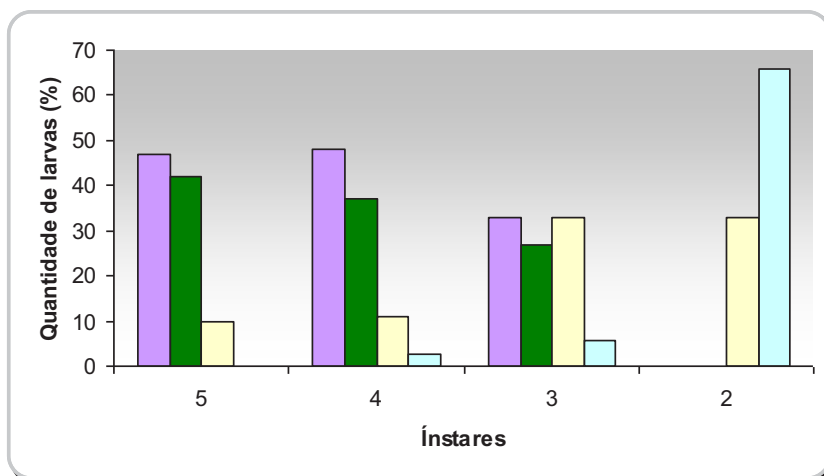


Figura 12. Efeito de EvV sobre o número de ínstaes de *P. interpunctella*. Controle (■); 0,2% (■); 0,5% (■); 1% (■).

4.4. Modelo de ação de vicilinas de *E. velutina* para larvas de *P. interpunctella*

4.4.1 - Digestibilidade *in vivo* de vicilina de *E. velutina* pelas larvas de *P. interpunctella*

O efeito da digestibilidade de EvV para larvas foi observado *in vivo*. As larvas de quinto ínstar foram alimentadas com dieta adicionada de EvV (0,5%, p/p). Após o ensaio as fezes de larvas alimentadas com vicilina foram coletadas e as proteínas extraídas com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. Essa amostra foi então submetida à eletroforese e depois as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando a técnica de imunoblot. Para detecção de vicilinas ou fragmentos gerados da degradação de EvV (Figura 13 A), foram utilizados os anticorpos anti-EvV. As bandas reativas, provenientes da degradação da vicilina pelas enzimas proteolíticas intestinais das larvas de *P. interpunctella*, encontraram-se na faixa de massa molecular de 116 a 66,2 kDa e de 35 a 25 kDa (Figura 13 B).

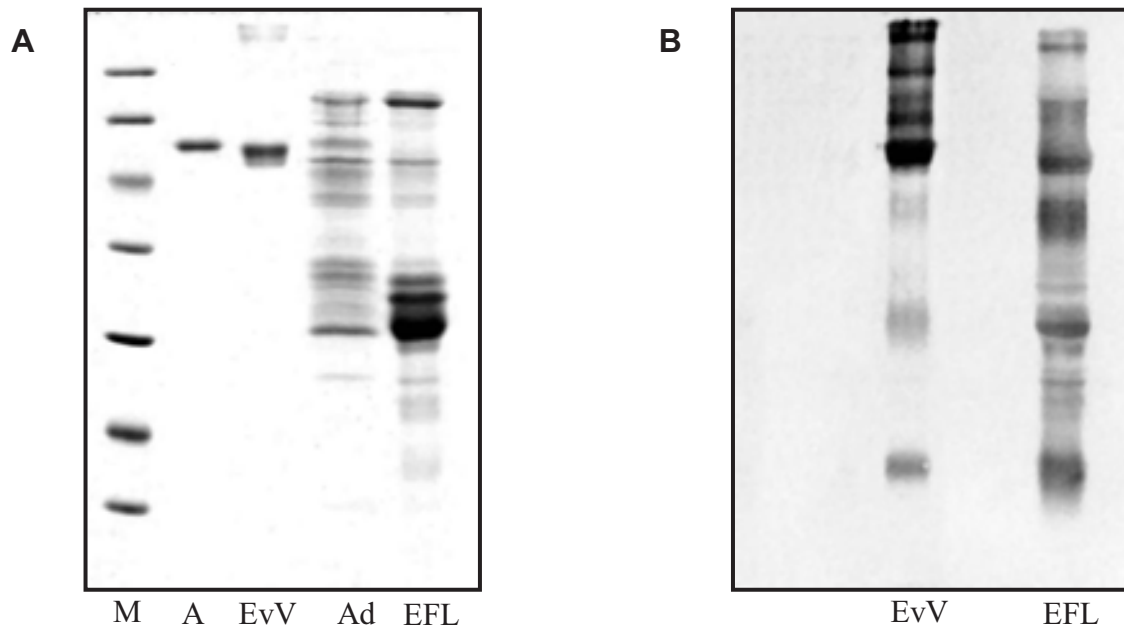


Figura 13. Digestibilidade de EvV *in vivo* pelas larvas de *P. interpunctella*. (A): Visualização por SDS-PAGE, onde, M: Marcador de massa molecular (β -galactosidase 116.0 kDa; albumina sérica bovina 66.2 kDa; ovoalbumina 45.0 kDa; lactato desidrogenase 35.0 kDa; enzima de restrição Bsp98 25.0 kDa; β -lactoalbumina 18.4 kDa, lisozime 14.4kDa); A: Albumina sérica bovina; EvV: Vicilina de *E. velutina*; Ad: Albumina digerida pelas enzimas digestivas de *P. interpunctella*; EFL: Extrato de fezes de larvas de *P. interpunctella*; (B): Revelação por imunoblot, onde: EvV: Vicilina de *E. velutina*; EFL: Extrato de fezes de larvas de *P. interpunctella*.

4.4.2 - Associação *in vivo* de EvV por constituintes de membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella*

4.4.2.1 - Detecção de quitina em membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella*

Utilizando o método químico qualitativo de von Wisselingh foi detectado a presença de quitina em membranas peritróficas de larvas de *P. interpunctella* (Tabela 6).

4.4.2.2 – Ensaio de afinidade, *in vivo*, de EvV à membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella*

Através de imunoblot foi visualizada a presença de um fragmento, com aproximadamente 35 kDa, que se ligou à membrana peritrófica de larvas alimentadas com EvV (Figura 14).

Tabela 6. Detecção de quitina em intestinos de larvas de *P. interpunctella* através de teste de Von Wisseling

Material testado	Coloração marrom (Iugol)	Coloração violeta (H ₂ SO ₄)
Intestinos de larvas	+	+
Quitina	+	+
Algodão	ND	ND

(ND) não detectado; (+) detecção. Controle positivo: quitina de lagosta; Controle negativo: algodão.

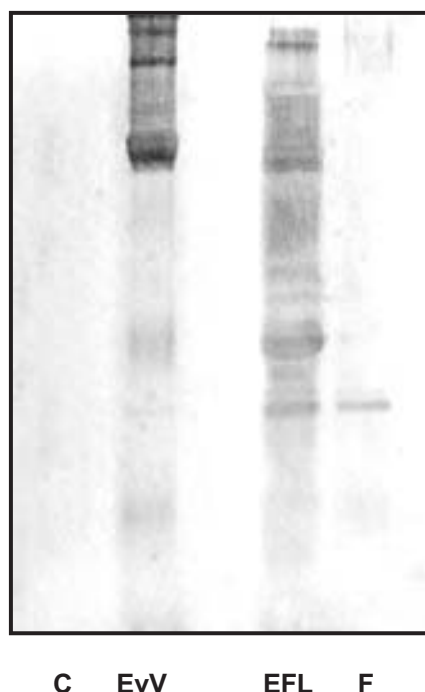


Figura 14. Ensaio de afinidade *in vivo* de EvV pela Membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella* visualizada por imunoblot. Dieta controle sem EvV (C); Vicilina de *E. velutina* (EvV); Extrato de fezes de larvas de *P. interpunctella* (EFL); Fragmento ligado à MP de larvas de *P. interpunctella* (F).

4.4.2.3 - Detecção da associação EvV-FITC em membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella* por fluorescência

Na figura 15 F foi observado fluorescência em toda extensão da membrana peritrófica das larvas, indicando que houve interação da vicilina com a membrana. Essa associação foi inibida com a adição de N-acetil D-glicosamina na dieta das larvas alimentadas com EvV-FITC (painel H). Os resultados indicaram que quitina

(polímero de N-acetil-glicosamina) presente na membrana peritrófica podem ser os possíveis sítios de interação.

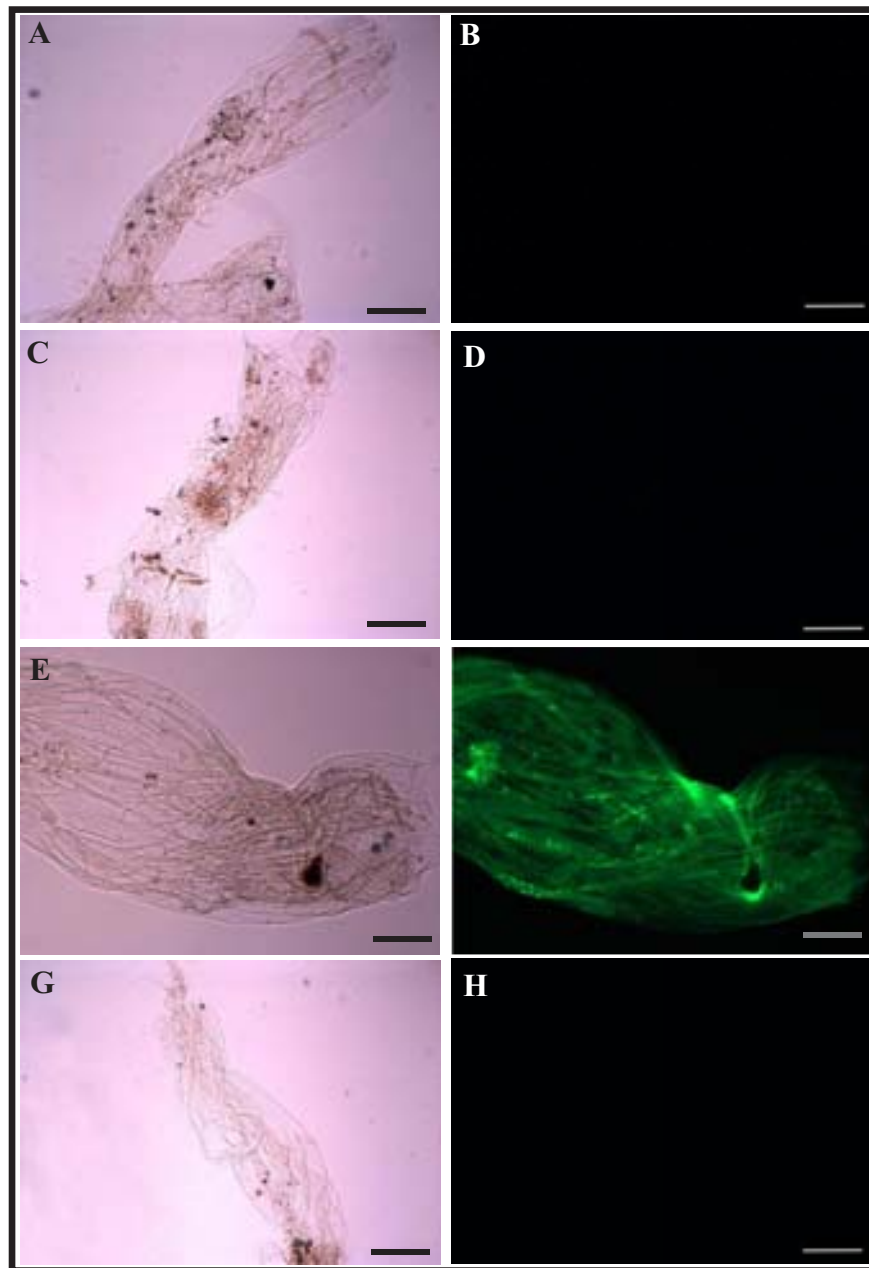


Figura 15. Fotomicrografia de fluorescência e óptica da membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella* alimentados em dietas contendo EvV-FITC acrescida ou não de N-acetil D-glicosamina. Painel A: Microscopia óptica da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão sem EvV.

Painel B: Microscopia de fluorescência da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão sem EvV.

Painel C: Microscopia óptica da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com N-acetil D-glicosamina.

Painel D: Microscopia de fluorescência da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com N-acetil D-glicosamina.

Painel E: Microscopia óptica da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com FITC-EvV.

Painel F: Microscopia de fluorescência da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com FITC-EvV.

Painel G: Microscopia de óptica da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com FITC-EvV e N-acetil D-glicosamina.

Painel H: Microscopia de fluorescência da da membrana peritrófica de larvas alimentadas em dieta padrão com FITC-EvV e N-acetil D-glicosamina.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de larvas de *P. interpunctella* alimentadas com diferentes dietas pode ser influenciado por fatores físicos, químicos e biológicos do próprio alimento. Por exemplo, larvas de *P. interpunctella* se desenvolvem mais rapidamente em dietas verdes do que em dietas secas, além disso, o período de desenvolvimento diminui significativamente de acordo com o aumento da temperatura (NA & RYOO, 2000). Em nosso estudo as larvas de *P. interpunctella* apresentaram cinco ínstars durante o seu desenvolvimento quando alimentadas com uma dieta artificial baseada em bagaço de cana seca. Este resultado está em acordo com os estudos de Allotey e Goswami (1990) e Mohandass *et al.* (2006) que afirmaram que as larvas de *P. interpunctella*, alimentadas com uma dieta padrão diferente, atingiram o máximo desenvolvimento no quinto ínstar, o que também foi observado por Perez-Mendoza e Aguilera-Peña (2004) quando larvas foram alimentadas com alho.

Estabelecidos os ínstars das larvas de *P. interpunctella*, alimentadas com a dieta artificial, os homogenatos intestinais de cada estágio foram preparados e atividades proteolíticas ácida e básica foram detectadas, durante todo o período de desenvolvimento. O maior índice de atividade enzimática básica por intestino foi detectado no estágio de pré-pupa, usando azocaseína como substrato a pH 9,5. Entretanto um padrão diferente se revelou quando os resultados foram expressos em atividade específica (UA/mg proteína), onde o maior índice de atividade enzimática básica foi encontrado no terceiro ínstar. Segundo Alarcón *et al.* (2002) a apresentação dos dados de atividade enzimática na forma de UA por mg proteína pode não fazer sentido do ponto de vista fisiológico, porque as variações da atividade específica são altamente influenciadas por variações da concentração de outras proteínas solúveis sem atividade proteolítica, que estariam também presentes

durante o desenvolvimento larval. Ainda de acordo com o mesmo autor, uma forma de evitar este efeito é a representação da atividade enzimática em relação a um único indivíduo (UA/intestino). Neste estudo, pode-se observar a predominância de atividade proteolítica a pHs básicos em ambas as formas de expressão das atividades enzimáticas. Esta atividade enzimática foi fortemente inibida por SBTI e TPCK, inibidores específicos de enzimas proteolíticas do tipo serínicas, indicando a predominância desta atividade enzimática no trato digestório das larvas de *P. interpunctella*. Atividade proteolítica básica do tipo serínica parece ser comum em lepidóptera, onde atividades do tipo tripsina e quimotripsina são as maiores detectadas nos homogenatos intestinais destes insetos (XAVIER-FILHO, 1993). No gênero *Plodia*, como observado por Oppert *et al.* (1996) também a predominância de atividade quimotripsínica, seguido de atividade tripsínica, foram detectadas em extrato luminal de larvas infectadas com *Bacillus thuringiensis*.

Em *Choristoneura occidentalis* foi observada alta atividade tipo-tripsina (82%), seguida por quimotripsina (75%) no fluido intestinal de larvas (VALAITIS; AUGUSTIN; CLANCY, 1999). Outros resultados se mostraram semelhantes quanto à predominância de atividade tríptica no trato intestinal de larvas, como encontrado em *Spodoptera frugiperda* (FERREIRA *et al.*, 1994); *Sesamia nonagrioides* (ORTEGO; NOVILLO; CASTANERA, 1996), *Spodoptera littoralis* (MARCHETTI *et al.*, 1998), *Diatraea saccharalis* (LOPES *et al.*, 2006). Embora na maioria dos insetos da ordem Lepidoptera, inclusive em *P. interpunctella*, ocorra a predominância de enzimas do tipo serínicas, a presença de outras enzimas proteolíticas, como carboxipeptidases foram reportadas (BOWN *et al.*, 1998; ORTEGO; NOVILLO; CASTANERA, 1996; CHRISTELLER *et al.*, 1992). O pH ótimo de atividade enzimática durante o desenvolvimento de larvas de *P. interpunctella* foi a pH 9,5 mantendo-se

praticamente constante até o pH 11,5. Segundo Applebaum (1985) o elevado pH básico é uma característica de proteinases serínicas do tipo tripsina em Lepidoptera, devido ao alto pH do intestino, em torno de pH 10 e 11. Um alto conteúdo de arginina em tripsina de lepidópteros pode também contribuir para a sua estabilidade em elevados valores de pH (PETERSON, FERNANDO, WELLS, 1995). As atividades básicas a pH 9,5 presentes no homogenato intestinal de larvas de terceiro ínstar e pré-pupa correspondem a duas bandas protéicas de baixa massa molecular que são inibidas e desaparecem dos zimogramas contendo azocaseína. Essas bandas de atividades desapareceram quando o homogenato foi pré-incubado com TLCK e retardadas quando incubadas com SBTI. As inibições das atividades das bandas protéicas com TLCK e SBTI provaram que duas enzimas serínicas do tipo tripsina poderiam ser potenciais alvos para o uso desse tipo de inibidor no controle dessa praga. Para comprovar a eficácia *in vitro* dos inibidores de tripsina, ensaios *in vivo* foram montados em que SBTI foi adicionado à dieta das larvas e mostrado seu efeito sobre o retardo do crescimento, a massa das larvas e sobre a mortalidade.

Diversos trabalhos relatam o efeito de SBTI quando adicionado à dieta de diferentes pragas. Larvas de *Spodoptera litura* sofreram redução no crescimento do primeiro ínstar, indicando que estas larvas são mais susceptíveis à ação de SBTI quando neonatas (McMANUS & BURGESS, 1995). Sagili *et al.* (2005) observaram o efeito do inibidor de tripsina de soja (SBTI) sobre abelhas alimentadas com pólen adicionado do inibidor e concluíram que ocorre uma maior mortalidade a partir da adição de 1% de SBTI à dieta. Em insetos da ordem Coleoptera também foi relatado efeito de SBTI no desenvolvimento e mortalidade. Em larvas de *Anthonomus grandis* SBTI causou uma redução de 64% no peso, bem como redução na sobrevivência. Várias deformidades no corpo das larvas, de pupas e de insetos adultos foram

também observadas (FRANCO *et al.*, 2003). Em nosso estudo, no entanto, não foi detectado efeito da adição de SBTI à dieta na massa das larvas nem na mortalidade. Isto pode ter acontecido devido à expressão de outras enzimas menos susceptíveis à presença do inibidor, ou superexpressão de enzimas susceptíveis, fazendo com que essa maior quantidade expressa supere a presença do inibidor na dieta, uma característica dos insetos desta ordem (BROADWAY, 1994; PAULILLO *et al.*, 2000).

A membrana peritrófica (composta por proteínas e quitina) que reveste internamente o intestino de vários insetos vem sendo bastante estudada recentemente como alvo para ação de proteínas bioinseticidas. Estas proteínas agem, principalmente, através de ligação à quitina presente na membrana peritrófica de muitos insetos. Em vista desta propriedade, estudos recentes propõem lectinas, quitinases e vicilinas, como possíveis formas de defesa contra insetos que possuem membrana peritrófica. O efeito deletério de lectinas, como a WGA (aglutinina de gérmen de trigo), foi observado para larvas de *Ostrinia nubilalis*, e visualizada através de ensaios imunohistoquímicos, a qual estava associada à membrana peritrófica do inseto (HARPER, HOPKINS & CZAPLA, 1998). Bioensaios empregados para a avaliação do efeito entomotóxico de lectinas purificadas de sementes de *Glycine max*, *Artocarpus heterophyllus*, *Triticum aestivum* e *Pisum sativum* foram feitos com larvas de *Helicoverpa armigera* e foi observado que uma lectina ligante à quitina de *Pisum sativum* foi mais efetiva (GUPTA, BIRA & RANI, 2005). Larvas de *Eoreuma loftini* (inseto da ordem Lepidóptera) sofreram redução no seu desenvolvimento causada pela adição de outra lectina ligante à quitina de *Galanthus nivalis* à dieta (SETAMOU, MIRKOV & LEGASPI, 2003).

Vicilinas 7S são os componentes mais recentes desta família de proteínas de defesa de plantas. A propriedade de ligação à quitina das vicilinas foi primeiramente

descrita por Sales *et al.*, (1996) que mostraram os efeitos deletérios para *C. maculatus*, observados *in vivo*, por Macedo *et al.* (1993). Esse efeito foi depois associado à propriedade de ligação desta proteína às matrizes compostas por quitina (FIRMINO *et al.*, 1996; SALES *et al.*, 2001, UCHÔA *et al.*, 2006). Outros estudos mostraram que vicilinas de *Vigna unguiculata* foram deletérias para lepidópteros como o inseto adulto de *Diatraea saccharalis* (MOTA *et al.*, 2003).

Este modelo de ação, utilizando proteínas ligantes à quitina, foi testado para *P. interpunctella*, pois este inseto possui membrana peritrófica durante o estágio larval. Este é o período de desenvolvimento do inseto de maior impacto para a agricultura, onde a perda de grãos armazenados é mais acentuada. A membrana peritrófica de *P. interpunctella* foi identificada pela microscopia de luz e pelo teste químico de von Wisselingh que detectou a presença de quitina.

A EvV causou mortalidade a partir da adição de 0,5% quando adicionada à dieta. Baixíssimos WD_{50} de 0,27% e LD_{50} de 0,23% foram calculados por meio das curvas construídas para EvV *versus* diminuição da massa de larvas e *versus* mortalidade. Trabalhos realizados utilizando vicilinas purificadas de sementes de outras espécies de plantas mostraram padrão semelhante contra diferentes insetos. Em trabalho realizado por Moura *et al.* (2007) foi verificado o efeito da ação de vicilina purificada de sementes de *Enterolobium contortisiliquum* sobre *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, no qual foi observado LD_{50} 1,11% e 0,43%, respectivamente. Valores bastante reduzidos de LD_{50} , em comparação ao presente estudo, foram encontrados quando larvas de *Helicoverpa armigera* foram alimentadas com lectinas de diferentes plantas, onde a mais deletéria para o inseto foi a de *Pisum sativum*, obtendo um LD_{50} de 0,0008% (GUPTA, BIRA & RANI, 2005). O valor de LD_{50} encontrado no bioensaio utilizando

larvas de *P. interpunctella* alimentadas com EvV foi menor do que o observado para *Anagasta kuehniella*, quando lectina de sementes de *Koeleria paniculata* foi adicionada à dieta, sendo para este inseto de 0,65% (MACEDO *et al.*, 2003). Trabalhos realizados indicam que esta mortalidade é provavelmente causada pela ligação da proteína bioativa à quitina encontrada na membrana peritrófica das larvas, comprometendo a passagem de moléculas através da mesma ou pela indigestibilidade dessas proteínas (Sales *et al.*, 1992; HIGGINS *et al.*, 1998; CZAPLA *et al.*, 1990; MOURA *et al.*, 2007).

Após a comprovação da ação inseticida de EvV sobre larvas de *P. interpunctella* foram avaliados os modelos de ação dessa proteína. Primeiramente um ensaio de digestibilidade *in vivo* foi realizado para mostrar se a proteína era degradada, ou não, durante a passagem pelo trato digestório das larvas. Após alimentação com dieta adicionada de EvV, fezes de larvas de quinto ínstar foram coletadas. Por meio de técnicas de imunodeteção foi observado que houve degradação da vicilina durante a passagem pelo trato intestinal das larvas. Este resultado difere do observado para vicilina de *E. contorsiliquum*, quando avaliada a digestão *in vivo*, onde não foi observada degradação por enzimas digestivas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* (MOURA *et al.*, 2007). Entretanto, este resultado está de acordo com o encontrado por Mota *et al.* (2003) onde vicilinas de *Vigna unguiculata* foram degradadas quando em contato com as proteinases associadas à membrana peritrófica de *Diatraea saccharalis*. A identificação de um fragmento imunoreativo nos ensaios de imunodeteção indicou que esta banda resultante da degradação da vicilina que se liga à membrana peritrófica, possivelmente estaria envolvida na mortalidade das larvas de *P. interpunctella*. Este modelo de liberação de fragmentos deletérios pode ser observado nos modelos de ação de *Bacillus*

thuringiensis, onde um fragmento liberado após ação das enzimas digestivas da larva hospedeira, provoca a mortalidade do inseto contaminado com a bactéria (Johnson, 1994). Segundo Wang e Granados (2001) a alta afinidade na ligação de proteínas da membrana peritrófica às fibras de quitina desempenha um papel crucial na formação da membrana sendo este um passo crítico que pode ser alvo em potencial para bloquear a formação da membrana. Portanto, moléculas que interfiram nesta ligação podem impedir a formação da membrana, resultando no retardamento do desenvolvimento larval, mortalidade das larvas e susceptibilidade à infecções (WANG & GRANADOS, 2000).

Após a verificação da ligação da vicilina de *E. velutina* à membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella*, por imunoblotting, foram realizados ensaios *in vivo* para corroborar os resultados obtidos neste ensaio. Para isso, larvas foram alimentados com dieta contendo EvV-FITC, sendo observada marcação na membrana peritrófica isolada. Esta associação foi desfeita pela introdução na dieta de N-acetilglicosamina, que é a unidade monossacarídica formadora da quitina. Resultado semelhante foi encontrado por Eiseman *et al.* (1994) quando verificou a ligação de diferentes lectinas de plantas à estruturas do intestino médio de *Lucilia cuprina*. Este autor observou que lectinas com especificidade para N-acetilglicosamina sofriam uma maior inibição de sua ação quando na presença deste monossacarídeo. Firmino *et al.* (1996) observaram a ligação de vicilinas de *Vigna unguiculata* à estruturas quitinosas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* através de western blotting. Sales *et al.* (2001) também observaram ligação de vicilinas de *V. unguiculata* à estruturas quitinosas do sistema digestório de *C. maculatus* utilizando ferramentas de imunohistoquímica.

Este trabalho é um dos primeiros a propor um mecanismo de ação efetivo contra *P. interpunctella* baseado nas propriedades tóxicas de proteínas de origem vegetal. Isto evidencia a grande potencialidade de proteínas antimetabólicas encontradas em sementes de leguminosas de vários ecossistemas, tanto regionais como nacionais, tornando-as candidatas a serem usadas como bioinseticidas, em programas de manejo integrado de pragas ou mesmo nos programas de melhoramento de plantas cultivadas.

6. CONCLUSÕES

- Duas possíveis proteinases serínicas alvo do tipo tripsina foram detectadas em homogenato intestinal de *P. interpunctella*, durante o desenvolvimento larval;
- O uso de SBTI como bioinseticida não causou mortalidade e nem redução no peso das larvas durante o desenvolvimento. Não sendo indicada para o controle alternativo desta praga.
- Membrana peritrófica em larvas de *P. interpunctella* foi detectada por testes químicos de detecção à quitina (componente principal da matriz) e por microscopia óptica. Tornando um provável alvo para uso de proteínas inseticidas ligantes à quitina.
- EvV, vicilina isolada por cromatografia de afinidade em uma coluna de quitina, quando adicionada à dieta (m/m), provocou 50% de mortalidade e 50% na redução do peso de larvas com uma na concentração de 0,23% (LD₅₀) e 0,27% (WD₅₀) respectivamente;
- EvV é degradada pelas enzimas digestórias das larvas durante a passagem pelo trato intestinal. Um fragmento imunoreativo, produto da digestão de EvV, foi liberado da membrana peritrófica, indicando que o efeito deletério observado no bioensaio pode ser causado por este fragmento protéico ligante à quitina ;
- A ligação da vicilina de *E. velutina* à membrana peritrófica de larvas de *P. interpunctella* foi confirmada por imunquímica e ligação de EvV-FITC indicando que

o sítio de acoplagem da proteína reside nesta estrutura. Desta forma, após ligação e digestão de EvV um fragmento protéico exerce a ação bioinseticida desta proteína.

7. REFERÊNCIAS

- ABE, K.; KONDO, H.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Oryzacystatins as the first well-defined cystatins of plant origin and their target proteinases in rice seeds. **Biomedical and Biochemistry Acta**. v. 50, 637–641, 1991.
- ABE, M.; DOMOTO, C.; WATANABE, H.; ABE, K.; ARAI, S. Structural organization of the gene encoding corn cystatin. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 60, n. 7, p. 1173-1175, 1996.
- ALARCON, F. J.; MARTINEZ, T. F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DIAZ, M.; MOYANO, F. J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera : Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 3, p. 265-274, 2002.
- ALLOTEY, J.; GOSWAMI, L. Comparative biology of 2 phycitid moths, *Plodia interpunctella* (Hubn) and *Ephestia cautella* (Wlk) on some selected food media. **Insect Science and Its Application**. v. 11, n. 2, p. 209-215, 1990.
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I., Editors. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 4, p. 279–311, 1985.
- ARAUJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA, T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A.; LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteins from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**. v. 85, n. 1, p. 107-110, 2004.
- ARBOGAST, R. T.; MULLEN, M. A. Spatial distribution of eggs by ovipositing indian meal moths, *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae). **Researches on Population Ecology**. v. 19, n. 2, p. 148-154, 1978.
- ARTHUR, F.H.; PHILLIPS, T.W., 2003. Stored-product insect pest management and control. **Food Science and Technology**. 120, p. 341-358, 2003.
- BAINES, D. M. Observations on peritrophic membrane of *Locusta migratoria migratoriodes* nymphs. **Acrida**. v. 7, n. 1, p. 11-21, 1978.
- BERNARDI, R.; PALMIERI, S. Isolation and inhibition of a trypsin-like activity from larvae of corn borer (*Ostrinia nubilalis*) using reverse micelles. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 6, p. 663-666, 1996.
- BERNER, R.; RUDIN, W.; HECKER, H. Peritrophic membranes and protease activity in the midgut of the malaria mosquito, *Anopheles stephensi* (Liston) (Insecta, Diptera) under normal and experimental conditions. **Journal of Ultrastructure Research**. v. 83, n. 2, p. 195-204, 1983.
- BEWLEY, J. D. & BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination (2nd ed.). **Plenum Press**. New York, 1994.

BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**. v. 1477, n. 1-2, p. 241-252, 2000.

BOLTER, C. J.; JONGSMA, M. A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase-inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**. v. 41, n. 12, p. 1071-1078, 1995.

BOTELLA, M.A.; XU, Y.; PRABHA, T.N.; ZHAO, Y.; NARASIMHAN, M.L.; WILSON, K.A.; NIELSON, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.A. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**. 112, p. 1201–1210. 1996.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 27, n. 7, p. 625-638, 1997.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Midgut carboxypeptidase from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: enzyme characterization, cDNA cloning and expression. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 28, n. 10, p. 739-749, 1998.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase-inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. v. 41, n. 2, p. 107-116, 1995.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L. A. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* - Alterations in the indianmeal moth larval gut proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 2, n. 1, p. 19-28, 2003.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CASEY, R.; DOMONEY, C.; ELLIS, N. Legume storage proteins and their genes. In: Minflin, B.J. (Ed.), **Oxford Surveys of Plant Molecular Biology and Cell Biology**. v. 3, Oxford University Press, Oxford, p. 1- 95, 1986.

CASU, R.E.; JARMEY, J.M.; ELVIN, C.M.; EISEMANN, C.H. Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. **Insect Molecular Biology**, 3, p.159 170, 1994.

CHRISPEELS, M. J.; DE SA, M. F. G.; HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**. v. 8, n. 2, p. 257-263, 1998.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**. v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.

CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae - dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.

COELHO, A.N. Relação entre o sistema proteolítico de *Callosobruchus maculatus* (F.) e inibidores de enzimas proteolíticas de *Vigna sinensis* (L.) Savi. **Tese de Mestrado defendida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC**. 1980

COLEBATCH, G.; EAST, P.; COOPER, P. Preliminary characterization of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 31, n. 4-5, p. 415-423, 2001.

COX, P.D.; BELL, C.H. Biology and ecology of moth pests of stored food. In: Gorham, J.R. (Ed.), **Ecology and Management of Food-Industry Pests**. FDA Technical Bulletin 4, Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, VA, p. 181-193. 1991.

CZAPLA, T. H.; LANG, B. A. Effect of plant-lectins on the larval development of european corn-borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn-rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae). **Journal of Economical Entomology**. 83 (6), p. 2480-2485, 1990

DERBYSHARE, E.; WRIGTH, D.J.; BOULTE, D. Legumin and vicilin storage protein of legume seeds. **Phytochemistry**. 15, p. 3-24, 1976.

DUNAEVSKY, Y E.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K. S. e BELOZERSKY, M. A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. **Molecular Biology**. Volume 39, n. 4, p. 608-613, 2005

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants - a study in coevolution. **Evolution**. v. 18, n. 4, p. 586-608, 1964.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A. N.; SITNIK, R.; TERRA, W. R. Digestive enzymes in midgut cells, endoperitrophic and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 26, n. 4, p. 299-313, 1994.

FRANCO, O. L.; DOS SANTOS, R. C.; BATISTA, J. A. N.; MENDES, A. C. M.; DE ARAUJO, M. A. M.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F.; DE FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**. v. 63, n. 3, p. 343-349, 2003.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R. Osmoprotectants - A plant strategy in response to osmotic stress. **Russian Journal of Plant Physiology**. v. 47, n. 1, p. 137-144, 2000.

FIRMINO, F.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; GOMES, V. M.; MIRANDA, M. R. A.; DOMINGUES, S. J. S.; XAVIER, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid

beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, n. 6, p. 749-756, 1996.

FOISSAC, X.; EDWARDS, M. G.; DU, J. P.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae) - identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 9, p. 967-978, 2002.

GARCÍA-CARREÑO, F.L.; HAARD, N. Characterization of protease classes in lagostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. **Journal of Food Biochemistry**, 17, p. 97-113. 1993.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A. M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 30, n. 10, p. 948-958, 1979.

GATEHOUSE, A. M. R.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; BABBE, S. M.; NEWELL, C. A.; GATEHOUSE, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Insect Physiology**. v. 45, n. 6, p. 545-558, 1999.

GATEHOUSE, A. M. R.; POWELL, K. S.; VAN DAMME, E. J. M.; GATEHOUSE, J., 1995. Insecticidal properties of plants lectins: Their potential in plant protection, in: PUTSZTAI, A.; BARDOCZ, S. (Eds), 1995. Lectins, biomedical perspectives. **Taylor & Francis Ltd Publishers**, 35-57.

GROSSI-DE-SÁ, M. F. ; CHRISPEELS, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) alpha-amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.

GRUDEN, K.; STRUKELJ, B.; RAVNIKAR, M.; POLJSAK-PRIJATELY, M.; MAVRIC, I.; BRZIN, J.; PUNGERCAR, J.; KREGAR, I. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterization and immunocytochemical localization studies. **Plant Molecular Biology**. 34, p. 317-323, 1997.

GRUTTER, M. G.; PRIESTLE, J. P.; RAHUEL, J.; GROSSENBACHER, H.; BODE, W.; HOFSTEENGE, J.; STONE, S. R. Crystal-structure of the thrombin hirudin complex - a novel mode of serine protease inhibition. **Embo Journal**. v. 9, n. 8, p. 2361-2365, 1990.

GUO, W.; LI, G. X.; PANG, Y.; WANG, P. A novel chitin-binding protein identified from the peritrophic membrane of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, n. 11, p. 1224-1234, 2005.

HARBONE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. **Academic Press** ed. New York. 1982.

HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. **Plant Physiology**. v. 121, n. 2, p. 497-506, 1999.

HIGGINS, T. J. V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 35, n., p. 191-221, 1984.

HIGGINS, T. J. V.; CHRISPPEELS, M. J.; DE SA, M. F. G. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**. 8 (2), p. 257-263, 1998.

HOWE, H. F. & WESTLEY, L.C. Ecological relationship of plants and animals. New York, **Oxford University Press**, 1988.

ISHIMOTO, M.; CHRISPPEELS, M. J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of alpha-amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**. v. 111, n. 2, p. 393-401, 1996.

JOHNSON, D. E. Cellular toxicities and membrane binding characteristics of insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* toward cultured insect cells. **Journal of Invertebrate Pathology**. 63, p. 123-129, 1994.

JOHNSON, J.A.; WOFFORD, P.L.; GILL, R.F. Developmental thresholds and degree-day accumulations of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts. **Journal of Economic Entomology**, 88, p. 734-742, 1995.

JOHNSON, J.A.; WOFFORD, P.L.; WHITEHAND, L.C. Effect of diet and temperature on development rates, survival, and reproduction of the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, 85, p. 561-566, 1992.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C.A. Expression of proteinase inhibitor-I and inhibitor-II in transgenic tobacco plants - effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 86 (24), p. 9871-9875, 1989.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *spodoptera exigua* larvae to plant proteinase-inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 92, n. 17, p. 8041-8045, 1995.

KONDO, H.; ABE, K.; NISHIMURA, I.; IWATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases, molecular cloning, expression and biochemical studies on oryzacystatin-II. **Journal of Biological Chemistry**. 265, p. 15832-15837, 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, 227, p. 680-685, 1970.

LE BERRE-ANTON, V.; NAHOUM, V.; PAYAN F.; ROUGÉ, P. Molecular basis for the specific binding of different amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of amylase. **Plant Physiology and Biochemistry** 38, p.657-665, 2000.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**. v. 42, n., p. 525-550, 1997.

LEHFELDT, C.; SHIRLEY, A. M.; MEYER, K.; RUEGGER, M. O.; CUSUMANO, J. C.; VIITANEN, P. V.; STRACK, D.; CHAPPLE, C. Cloning of the SNG1 gene of arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. **Plant Cell**. v. 12, n. 8, p. 1295-1306, 2000.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, n. 2, p. 130-140, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, p. 265-275, 1951.

MACEDO, M. L. R.; ANDRADE, L. B. D.; MORAES, R. A.; XAVIERFILHO, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology C- Pharmacology Toxicology & Endocrinology**. v. 105, n. 1, p. 89-94, 1993.

MACEDO. M.L.R; DAMICO, D.C.S.; FREIRE, M.G.M.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine-binding lectin from *Koelneuteria paniculata* and its effect on larval development of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, 2980-2986, 2003.

MAIA, A. H. N.; DOURADO, D. N. Probabilistic tools for assessment of pest resistance risk associated to insecticidal transgenic crops. **SciELO**. v. 61, n.5, p.481-485, 2004.

MALDONADO, S. H. G.; MARINJARILLO, A.; CASTELLANOS, J. Z.; DEMEJIA, E. G.; ACOSTAGALLEGOSC, J. A. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera:Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) varieties. **Journal of Stored Products Research**. v. 32, n. 1, p. 53-58, 1996.

MARCHETTI, S.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; BANDIERA, A.; PITOTTI, A. Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 28, n. 7, p. 449-458, 1998.

MBATA, G. N. Studies on the Susceptibility of Groundnut Varieties to Infestation by *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera, Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**. v. 23, n. 1, p. 57-63, 1987.

MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**. 41 (9), p. 731-738, 1995.

MELO, F. R.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; MELLO, L. V.; ARY, M. B.; DE SA, M. F. G.; BLOCH, C. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. **Proteins-Structure Function and Genetics**. v. 48, n. 2, p. 311-319, 2002.

MELO, F. R.; SALES, M. P.; PEREIRA, L. S.; BLOCH, C.; FRANCO, O. L.; ARY, M. B. alpha-amylase inhibitors from cowpea seeds. **Protein and Peptide Letters**. v. 6, n. 6, p. 385-390, 1999.

MERZENDORFER, H. Insect chitin synthases: a review. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**. v. 176, n. 1, p. 1-15, 2006.

MITTAPALLI, O.; WISE, I. L.; SHUKLE, R. H. Characterization of a serine carboxypeptidase in the salivary glands and fat body of the orange wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera : Cecidomyiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, n. 2, p. 154-160, 2006.

MOFFATT, M.R.; BLAKEMORE D.; LEHANE, M.J. Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-biochemistry & Molecular Biology**. 110(2): 291-300. 1995,

MOHANDASS, S.; ARTHUR, F. H.; ZHU, K. Y.; THRONE, J. E. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. **Journal of Stored Products Research**. v. 43, n. 3, p. 302-311, 2006.

MOTA, A. C.; DAMATTA, R. A.; LIMA, M.; SILVA, C. P.; XAVIER, J. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins bind to the peritrophic membrane of larval sugarcane stalk borer (*Diatraea saccharalis*). **Journal of Insect Physiology**. v. 49, n. 9, p. 873-880, 2003.

MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, L. L. P.; VIANNA, A. L. B. R.; ANDRADE, L. B. S.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, E. A.; DE SALES, M. P. Effects of a chitin-binding vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 2, p. 260-266, 2007.

MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLADSEN, P.; WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from

larvae of *Chrysomya bezziana*, the old world screwworm fly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 31, n. 11, p. 1029-1040, 2001.

MULLEN, M. A.; ARBOGAST, R. T. Influence of substrate on oviposition by 2 species of stored-product moths. **Environmental Entomology**. v. 6, n. 5, p. 641-642, 1977.

MULLER, H.M.; CRAMPTON, J.M.; DELLATORRE, A.; SINDEN, R.; CRISANTI A. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. **Embo Journal**, 12 (7), p. 2891-2900, 1993.

NA, J.H.; RYOO, M.I. The influence of temperature on development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera : Pyralidae) on dried vegetable commodities. **Journal of Stored Products Research**. v. 36, n. 2, p. 125-129, 2000.

OPPERT, B.; JOHNSON, K. Insect digestion: Potential applications in insect management - Preface. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 55, n. 3, p. Iv-Iv, 2004.

OPPERT, B.; KRAMER, K.J.; JOHNSON, D.; UPTON, S.J.; MCGAUGHEY, W.H. Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) protoxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 26, n. 6. p. 571-583, 1996.

ORTEGO, F.; NOVILLO, C.; CASTANERA, P. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 33, n. 2, p. 163-180, 1996.

PANIZZI, A. R. & PARRA, J. R. Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. **Ed. Manole Ltda- CNPq**, São Paulo. 1991

PEREZ-MENDOZA, J.; AGUILERA-PENA, M. Development, reproduction, and control of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera : Pyralidae), in stored seed garlic in Mexico. **Journal of Stored Products Research**. v. 40, n. 4, p. 409-421, 2004.

PETERS, W. Peritrophic membranes. **Zoophysiology**, v. 30, Springer-Verlag, Berlin, p. 238, 1992.

PETERSON, A. M.; FERNANDO, G. J. P.; WELLS, M. A. Purification, Characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 25, n. 7, p. 765-774, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**. 109, p. 347-352, 1995.

PHILLIPS, T. W.; STRAND, M. R. Larval Secretions and food odors affect orientation in female *Plodia interpunctella*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**. v. 71, n. 3, p. 185-192, 1994.

RAMALHO-ORTIGAO, J. M.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M. C.; VALENZUELA, J. G. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, n. 2, p. 163-171, 2003.

RAMOS, A.; MAHOWALD, A.; JACOBSLORENA, M. Peritrophic matrix of the black fly *Simulium vittatum* - formation, structure, and analysis of its protein-components. **Journal of Experimental Zoology**. v. 268, n. 4, p. 269-281, 1994.

REES, D. Insects of Stored Products. **CSIRO Publishing**, Collingwood, Victoria, Australia, 2004.

ROGER, H. J.; PERKINS, H. R. Cell walls of filamentous fungi. **E. and F. N. Spon**: London, v. 23, capítulo 9, p. 153-160, 1968.

ROSE, T. L.; GOMES, V. M.; DA CUNHA, M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, J. Effect of sugars on the association between cowpea vicilin (7S storage proteins) and fungal cells. **Biocell**. v. 27, n. 2, p. 173-179, 2003.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants - genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**. v. 28, n., p. 425-449, 1990.

RYAN, S. N.; LAING, W. A.; MCMANUS, M. T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. **Phytochemistry**. v. 49, n. 4, p. 957-963, 1998.

SAGILI, R. R.; PANKIW, T., ZHU-SALZMAN, K. Effects of soybean trypsin inhibitor on hypopharyngeal glandprotein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**. 51(9), p. 953-957, 2005.

SALES, M. P.; PIMENTA, P. P.; PAES, N. S.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER, J. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, n. 1, p. 27-34, 2001.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**. v. 124, n. 2, p. 515-522, 2000.

SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER, J. Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, n. 3, p. 319-326, 1996.

SALES, M.P.; MACEDO, M.L.R.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 103B, p. 945–950, 1992.

SECUNDINO, N. F. C.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E. M.; SANTORO, M. M.; PIMENTA, P. F. P. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: Formation, structure, and chemical composition. **Journal of Medical Entomology**. v. 42, n. 6, p. 928-938, 2005.

SETAMOU, M.; BERNAL, J. S.; MIRKOV, T. E.; LEGASPI, J. C. Effects of snowdrop lectin on Mexican rice borer (Lepidoptera : Pyralidae) life history parameters. **Journal of Economic Entomology**. v. 96, n. 3, p. 950-956, 2003.

SILVA, F. C. B. L.; ALCAZAR, A.; MACEDO, L. L. P.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; ABREU, L. R. D.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Digestive enzymes during development of *Ceratitidis capitata* (Diptera : Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, n. 7, p. 561-569, 2006.

SIMMONS, P. ; NELSON, H.D. Insects on dried fruits. **USDA, Agricultural Handbook**, Washington, DC. 1975.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in Lepidopteran serine proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters**. v. 11, n. 1, p. 132-154, 2006.

STOREY, R. D.; WAGNER, F.W. Plant proteases – a need for uniformity. **Phytochemistry**, 25 (12), p. 2701-2709, 1986.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.

TERRA, W, R; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function, Review. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 109B, n.,1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review of Entomology**. v. 35, n., p. 181-200, 1990.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**. v. 113, n. 4, p. 725-730, 1996.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A.G. Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 56B, p. 201-209, 1977.

TOWBIN, H.; STACHELIN, N.T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 76, p. 4350-4354, 1979.

UCHOA, A. F.; DAMATTA, R. A.; RETAMAL, C. A.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; SOUZA, S. M.; SAMUELS, R. I.; SILVA, C. P.; XAVIER, J. Presence of the storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 52, n. 2, p. 169-178, 2006.

VALAITIS, A. P.; AUGUSTIN, S.; CLANCY, K. M. Purification and characterization of the western spruce budworm larval midgut proteinases and comparison of gut activities of laboratory-reared and field-collected insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 29, n. 5, p. 405-415, 1999.

VAZQUEZ-ARISTA, M.; SMITH, R. H.; MARTINEZ-GALLARDO, N. A.; BLANCO-LABRA, A. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera : Bostrichidae). **Journal of Stored Products Research**. v. 35, n. 2, p. 167-174, 1999.
Victoria, Australia. 2004.

VOLPICELLA, M.; CORDEWENER, J.; JONGSMA, M. A.; GALLERANI, R.; CECI, L. R.; BEEKWILDER, J. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor-resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. v. 833, n. 1, p. 26-32, 2006.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 47, p. 110-118, 2001.

WIEMAN, K. F.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**. v. 89, n. 2, p. 419-426, 1988.

WOLFGANG W. ; MÖHRLINI, F.; SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Insect biochemistry and molecular biology**. v. 32, n.7, p. 803-814, 2002.

XAVIER-FILHO, J. e COELHO A. Acid proteinases of *Callosobruchus maculatus* and proteinase inhibitors of *Vigna unguiculata*. Abstract from the **Annual Meeting of the American Society of Plant Physiology and Phytochemical Society of North America**. Plant Physiology,65, p. 138, 1980.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira De Fisiologia Vegetal**, 4, 1992

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. **Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos – OEA**, 1, 1993.

ZENG, F. R.; ZHU, Y. C.; COHEN, A. C. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera : Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 4, p. 455-464, 2002.

ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**. v. 12, n. 2, p. 135-145, 2003.